

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Anaïs GIACINTI

**Implication fonctionnelle des vaisseaux
sanguins cérébraux dans le processus de
consolidation mnésique**

Sous la direction de Nathalie MACREZ
co-directeur : Bruno BONTEMPI



Soutenue le 01/12/2014

Membres du jury :

Mme BRUNET Isabelle
M. POU CET Bruno
M. BIKFALVI Andreas
M. ROULLET Pascal
Mme MACREZ Nathalie

CR1, INSERM
DR, CNRS
Pr, INSERM
Pr, CNRS
DR, CNRS

Paris
Marseille
Bordeaux
Toulouse
Bordeaux

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Titre : Implication fonctionnelle des vaisseaux sanguins cérébraux dans le processus de consolidation mnésique

Résumé :

S'il est bien établi que le flux sanguin cérébral est distribué en fonction de la demande métabolique des neurones, aucune étude n'a exploré la contribution du réseau vasculaire au processus de consolidation mnésique qui requiert un dialogue hippocampo-cortical permettant le remodelage progressif des réseaux neuronaux corticaux sous-tendant la trace mnésique ancienne stabilisée.

Utilisant un test comportemental induisant une mémoire olfactive associative chez le rat couplé à des techniques d'imagerie cellulaire *ex vivo*, nous montrons pour la première fois, chez le rat adulte sain, une dissociation fonctionnelle entre réactivité et architecture du réseau vasculaire cérébral. Nous mettons en évidence des modifications de signalisation calcique des artères cérébrales qui suggèrent que leur dynamique s'adapte pour permettre l'expression du souvenir. De plus, suivant une cinétique différente, le réseau vasculaire se densifie par angiogenèse dès le lendemain de l'apprentissage, y compris dans les régions du cortex ne prenant en charge le souvenir que plusieurs semaines plus tard. En stimulant spécifiquement cette angiogenèse par injection d'agents pharmacologiques dans le cortex, nous améliorons les performances des rats lors du rappel de mémoire ancienne.

Pris dans leur ensemble, nos résultats soulignent l'importance de la plasticité vasculaire dans la modulation de la plasticité neuronale et des fonctions cognitives. Ils suggèrent en outre que les changements structuraux précoces du réseau vasculaire pourraient constituer un mécanisme permissif à l'origine de la régulation des épines dendritiques corticales impliquées dans la formation et le stockage à long terme des souvenirs.

Mots clés : *consolidation mnésique, réseau vasculaire cérébral, signalisation calcique, angiogenèse.*

Title : Functional implication of cerebral vascular networks in memory consolidation

Abstract :

While there is consensus that cerebral blood flow is distributed according to the metabolic demand of neurons, the contribution of vascular networks to memory consolidation, the process by which memories acquire stability over time, remains unknown. This process requires a transitory hippocampal-cortical interaction allowing the progressive remodeling of cortical neuronal networks supporting the remote memory trace.

By using a behavioral task requiring an associative olfactory memory coupled to cellular imaging techniques, we first reveal, in adult healthy rats, a functional dissociation between the reactivity and the architecture of cerebral vascular networks. We identify calcium signaling changes that occur in specific cerebral arteries, pointing to their ability to adapt their dynamics upon retrieval to enable the successful expression of either recent or remote memories. Moreover, we show that vascular networks undergo a time-dependent densification via an angiogenesis mechanism as early as one day after learning, including in cortical regions which will only support memory storage and retrieval weeks later. By specifically stimulating this early cortical angiogenesis, we were able to improve the performance of rats tested for remote memory.

Taken together, our results highlight the importance of vascular plasticity in modulating neuronal plasticity and cognitive functions. They also suggest that the early structural changes within vascular networks could constitute a permissive mechanism which regulates the development of cortical dendritic spines thought to support the progressive formation and storage of enduring memories.

Keywords : *memory consolidation, cerebral vascular network, calcium signaling, angiogenesis.*

Une partie de ces travaux de thèse a fait l'objet de présentations de posters (annexes en fin de thèse) :

Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (avril 2013)

Giacinti A, Bontempi B, Macrez N.

Functional implication of the cerebral vascular network in memory consolidation.

Congrès de la Society for Neuroscience (novembre 2013)

Giacinti A, Nicole O, Biendon N, Bontempi B, Macrez N.

Effects of intracerebral VEGF injections on microvascular density and hippocampal-dependent memory.

Ils ont fait l'objet d'une présentation orale :

Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (avril 2014)

Implication fonctionnelle des vaisseaux sanguins cérébraux dans la consolidation mnésique.

Celle-ci a été récompensée par le prix de la meilleure communication orale.

**Institut des Maladies Neurodégénératives
CNRS UMR 5293**

Université de Bordeaux Bâtiment B2
Allée Geoffroy St Hilaire / CS 50023
33615 Pessac Cedex

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs de thèse Isabelle Brunet et Bruno Poucet ainsi que mes examinateurs Andreas Bikfalvi et Pascal Rouillet pour leur disponibilité et le temps qu'ils ont accepté de consacrer à ce travail. Les regards extérieurs sont toujours d'une grande aide pour faire avancer notre réflexion ; merci d'avance pour le vôtre.

Nathalie, je suppose que donner initialement ta confiance à quelqu'un qui n'avait jamais manipulé de rats et manquait sérieusement de notions en biologie cellulaire et moléculaire n'a pas dû être facile. Merci pour cette confiance, merci pour ta pédagogie qui m'a permis d'y voir de plus en plus clair dans les histoires vasculaires remplies de protéines aux noms bizarres et aux trop multiples fonctions. Que c'est compliqué, la bio ! Et merci pour ta grande implication dans ce projet, qu'elle soit manuelle en participant à des manips, ou intellectuelle en te plongeant en profondeur dans les réflexions concernant les résultats, les expériences à mener, et la compréhension de la consolidation mnésique et du comportement chez le rat. Cela a été un plaisir de travailler et réfléchir à tes côtés, du début à la fin. Je te souhaite une bonne continuation, dans toutes les choses que tu juges essentielles.

Bruno, je te remercie de m'avoir ouvert les portes de ton équipe et de m'avoir laissée travailler sur un sujet qui te tenait à cœur. La passion débordante que tu manifestes à l'égard de ton travail m'avait donné l'envie de m'y joindre. La passion pour la science, voilà bien une chose que nous partageons, et qui rendait possible de mener efficacement un travail de recherche ensemble, jusqu'au bout. Merci de m'avoir introduite dans le monde fascinant du comportement, et de m'avoir permis de participer au congrès de la SfN, source de nombreuses réflexions. Dommage que nous n'ayons pas trouvé une fin plus élégante.

Nathalie (Biendon), tu as été beaucoup réquisitionnée en fin de ma thèse, tout comme au tout début, quand il s'agissait de m'apprendre les marquages et de m'aider à m'y retrouver dans le rangement du matériel... Merci pour les marquages BrdU, leur longue mise au point, et pour la qPCR. Sans oublier ton efficacité à t'occuper encore et toujours des commandes de l'équipe ! Et puis, tu étais une oreille à qui j'ai toujours trouvé agréable de parler. Un caractère trempé et une grande gentillesse de fond.

Olivier, merci avant tout pour la patience que tu as manifestée à mon égard. Lorsqu'il s'agissait de m'apprendre à piquer un rat en i.p. (et se moquer de moi, hein), de rester à mes côtés parce que je n'osais pas opérer toute seule un rat sans une présence dans la salle de chirurgie à mes débuts, tu comprends, s'il venait à se réveiller d'un coup... Tu

as toujours été prêt à donner un coup de main quand on en avait besoin, pour des injections, pour le nouvel objet et j'en passe. Ce n'était pas la peine de faire semblant d'être désagréable en lançant en continu des piques : non, ça ne prend pas, tu n'arrives pas à cacher ta bonne volonté sincère ! Et je t'en remercie.

Merci aussi aux animalières – Dominique, Nathalie, Jennifer (et rapidement Yoan), pour avoir pris soin de mes p'tits rats. Merci à Nathalie Dutheil pour le temps passé à développer les virus, et à Caroline Vouillac pour nos divers essais d'injections.

Vient ensuite le petit groupe de thésards ou ingénieurs ou techniciens avec qui j'ai pu partager le bureau, les salles de manips, les repas, les histoires... La vie au labo ne serait pas la même si ce noyau dynamisant et parfois distrayant n'était pas là. Un merci à vous tous. Ben, pour ton énergie et ta rigueur qui rendaient le travail en commun bien agréable, et pour ta curiosité, ton ouverture d'esprit qui n'a pas peur de s'aventurer hors des normes. Gratianne, pour tes moments de folie, pour la bonne humeur inconditionnelle dont tu inondais les couloirs du labo. Alice, pour les tiramisu, les discussions partagées, avec ton bel accent italien. Sans oublier Senka, Voja, Hiyam, Adeline, Amandine, Carole, Yves, Sébastien, Julien, Claire, Oussama, Flora, Karine, Anne-Lise, et ces moments mémorables dans la salle du 4^{ème}... Et FP, pour ton côté décalé rafraîchissant, et pour notre (belle) aventure japonaise que je garderai longtemps en mémoire.

Jean-Luc, je te remercie à la charnière entre travail et amis, parce que voilà. Le Jean-Luc qui m'a tant apporté au cours de ces années bordelaises, c'est avant tout celui qui m'apprenait à cuisiner un saumon, à flâner dans les librairies, à apprécier le vrai thé pas de chez Lipton et le vrai fromage pas de grande surface, à manier le SMS littéraire, à me bobo-iser de façon assumée, à tester les différents glaciers de la ville, à m'ouvrir à la richesse de sa vie et de ses amis. C'est aussi le Jean-Luc binôme des interventions grand public, de la région bordelaise jusqu'au lycée français de Rome. Tu m'as aidée à apprécier le travail tellement plein de sens des médiateurs scientifiques, ces passeurs ayant à cœur de partager la connaissance. Merci pour la saveur de ces mille (ou plus) moments. Et à bientôt derrière une tisane, une glace ou un rayon de la Machine à Lire ou du Géant des Beaux-Arts.

Et puis il y a l'AJ, aussi. La fameuse Antenne Jeunes d'Amnesty International à Bordeaux, avec qui nous avons tant fait, y compris des flops mémorables. Mais c'était beau, c'était frais, c'était génial que de vouloir, ensemble, changer le monde comme on le pouvait, pour en faire quelque chose de plus juste. Il en fallait de la foi, quand on envoyait des pétitions adressées à certains chefs d'Etat en espérant qu'elles aient un impact, un peu comme quand on lançait au labo la 4^{ème} manip avec le Vatalanib. De la

foi, de l'enthousiasme communicatif : Sébastien, Steve, Djamila, Léopold, Oriane, pour ne citer que quelques noms dont le tempérament m'a particulièrement marquée... Merci à vous pour ces moments d'enthousiasme et de fraîcheur qui m'aéraient l'esprit.

L'évasion forestière était sans doute le bol d'oxygène le plus efficace... La course d'orientation, ce n'est pas que la pluie, la boue, les ronces, les branches dans le visage, les moments de solitude et les mauvaises lectures de carte : non, c'est aussi la grande famille du SAGC Cestas. C'est Alain avec son incroyable dynamisme, son grain de douce folie, ses bons vins à tester. Monique et sa gentillesse débordante. Maryse et sa bonne humeur communicative. Jean-François et son humour irrésistible. Gérard et ses passionnantes discussions. Et tous les autres... Ce sont des week-ends où l'on s'oublie, où l'on s'évade, où le corps revit. Merci !

Et je finirai avec ceux dont l'amitié m'a apporté un réel soutien. David, toi qui t'es aventuré dans la voie de la recherche avant moi, qui m'as aidée à en tirer certaines leçons et as su me donner des conseils précieux pour garder un bon équilibre psychologique tout au long du chemin de la thèse. Marie, Lionel, Mathilde, Youna, Lionel, pour votre agréable présence régulière. Denise, Raphaël, Marion, Cécile pour les moments partagés trop peu nombreux mais toujours de valeur. Ainsi que Guillaume, Sébastien, bien qu'à une trop grande distance de Bordeaux, avec qui on s'est tant interrogé sur les façons de donner du sens à son existence. Et puis Florian, last but not least, toi qui par ta simple présence sais me ramener à des choses essentielles de la vie : la gentillesse, la générosité, la nature... Merci de partager ma vie. Merci aussi à toi Inaya de nous faire rire quotidiennement, avec ce cocktail de folie, d'énergie débordante, d'intelligence parfois limitée, avec ta bouille tout plein mignonne et ta fierté de chat.

Enfin, merci à Bernard Alaux et Nathalie Macrez (encore !) de m'avoir parlé des offres d'emploi de l'IdEx de l'Université de Bordeaux. Elles correspondaient en effet assez à mon profil pour que je puisse y trouver mon bonheur pour l'année à venir au moins.

Sommaire

Introduction Générale	1
I. Le processus de consolidation mnésique	3
1) Le cas du patient H.M. : une introduction aux différents systèmes de mémoire et au concept de consolidation mnésique	3
2) Consolidation cellulaire et consolidation systémique	5
3) La théorie standard de la consolidation mnésique	6
4) Le test de Transmission Sociale de Préférence Alimentaire (TSPA)	8
II. Vaisseaux sanguins cérébraux et fonctionnement du cerveau	13
1) Généralités sur le réseau vasculaire cérébral	13
2) Unité neurovasculaire et hyperhémie fonctionnelle	16
3) Vaisseaux sanguins cérébraux et mémoire	20
III. Objectifs de la thèse	24
 Etude corrélative: réactivité vasculaire	 27
Changements de signalisation calcique au sein des artères piales cérébrales au cours de la consolidation mnésique	
I. Introduction sur la signalisation calcique vasculaire	28
1) Implication de la signalisation calcique vasculaire dans la régulation de la dynamique des vaisseaux sanguins cérébraux	28
2) Mécanismes de la signalisation calcique vasculaire	29
II. Réponse <i>ex vivo</i> des artères cérébrales à des médiateurs provoquant leur contraction	33
1) Protocole expérimental	33
2) Résultats comportementaux	34
3) Réponse des ACP à la caféine et au KCl	35
4) Réponse des ACA à la caféine et au KCl	37
5) Conclusion	38
III. Discussion	39

Etude corrélative: architecture vasculaire	43
Changements de densité vasculaire et prolifération cellulaire au cours de la consolidation mnésique	
I. Introduction sur les mécanismes de l'angiogenèse	44
1) Différents modes d'angiogenèse	44
2) Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse par « sprouting »	45
II. Changements de densité de vaisseaux sanguins et de densité d'embranchements vasculaires au cours de la consolidation mnésique	50
1) Protocole expérimental	50
2) Résultats comportementaux	52
3) Analyse de la densité vasculaire	53
4) Analyse de la densité d'embranchements vasculaires	55
5) Conclusion	56
III. Etude de la prolifération cellulaire au début du processus de consolidation mnésique	57
1) Protocole expérimental	57
2) Résultats du double marquage BrdU / Collagène IV	58
3) Conclusion	60
IV. Discussion	61
 Etude invasive: modulation de l'angiogenèse	 66
Implication fonctionnelle de l'angiogenèse corticale précoce dans le processus de consolidation mnésique	
I. Introduction sur les stratégies de modulation de l'angiogenèse	67
1) Blocage de l'angiogenèse en ciblant le VEGF ou ses récepteurs	67
2) Modulation de l'angiogenèse en ciblant les angiopoïétines 1 et 2	69
3) siRNA, shRNA, oligonucléotides antisens, quels outils pour quoi ?	70
4) Vue d'ensemble sur le chapitre	71
II. Blocage systémique de l'angiogenèse précoce par injection de Vatalanib	73
1) Injections intrapéritonéales à 50mg/kg	73
2) Injection intrapéritonéale à 25mg/kg	74

3) Injections intrapéritonéales répétées à 25mg/kg	75
4) Injections <i>per os</i> répétées à 50mg/kg	76
5) Injections intracérébrales	77
6) Conclusion	79
III. Blocage de l'angiogenèse corticale précoce par injection	
d'ONAS dirigés contre Ang-2.....	80
1) Essais d'injections intraveineuses	80
2) Injection d'ONAS à 6µg/µL dans le cortex orbitofrontal	81
3) Détermination de la concentration d'oligonucléotides à injecter	83
4) Conclusion	85
5) Expérience complémentaire : injection des AAVs codant pour un shRNA anti-Ang-2	85
IV. Stimulation de l'angiogenèse corticale précoce par injection	
d'Ang-2 exogène.....	87
1) Protocole expérimental	87
2) Résultats comportementaux	88
3) Analyse de la densité de vaisseaux sanguins et de la densité d'embranchements vasculaires	89
4) Conclusion	90
V. Discussion	91
 Un principe généralisable?	 96
Augmentation de densité vasculaire et amélioration des performances mnésiques (résultats préliminaires)	
I. Introduction : modèle d'angiogenèse cérébrale et tests mnésiques utilisés.....	97
1) Provoquer l'angiogenèse cérébrale par injection de VEGF	97
2) Test de reconnaissance de nouvelle position d'objet	98
3) Test de labyrinthe radiaire	100
II. Cinétique du développement du réseau vasculaire cérébral suite à une injection de VEGF.....	102
1) Protocole expérimental	102
2) Résultats des marquages de marqueurs angiogéniques	103
3) Conclusion	105

III. Développement du réseau vasculaire hippocampique et performances dans le test de reconnaissance de nouvelle position d'objet	106
1) Implication de l'hippocampe dorsal	106
2) Effet de l'injection de VEGF intrahippocampique	107
3) Conclusion	108
IV. Développement du réseau vasculaire hippocampique et performances dans le test de labyrinthe radiaire	109
1) Protocole expérimental	109
2) Effet de l'injection de VEGF intrahippocampique	109
3) Analyse <i>a posteriori</i> du réseau vasculaire hippocampique	112
4) Conclusion	112
V. Discussion	113
 Discussion générale	 117
I. Synthèse des principaux résultats et perspectives	118
II. Au-delà du choix des régions ciblées	124
III. Contrôler l'interaction	129
 Conclusion générale	 132
 Matériels et méthodes	 135
Animaux	136
Tests comportementaux	136
Chirurgie – implantation des guides canules	141
Drogues et modes d'injection	142
Procédure d'injection intracérébrale	145
Perfusion et coupes	145
Imagerie calcique sur vaisseaux cérébraux isolés	146
Marquages	148
Analyse d'images	150
Statistiques	151

Bibliographie	153
 Annexes	 171
Poster présenté à la Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé en 2013	 172
Poster présenté au congrès de la Society for Neuroscience en 2013	173
Liste des abréviations	174
Liste des figures	176

Introduction Générale

Introduction Générale

Tout notre savoir, nos connaissances sur le monde seraient impossibles sans la mémoire, cette aptitude intellectuelle que nous partageons avec d'autres êtres vivants à restituer des informations du passé. Et nous-mêmes, que serions-nous sans mémoire autobiographique, cet ensemble de souvenirs relatifs à notre personne qui forge notre identité ? Comme le disait avec poésie Charles Péguy, « c'est la mémoire qui fait toute la profondeur de l'Homme »... C'est aussi elle qui nous permet de lier passé, présent et futur, d'établir des plans d'avenir en fonction de nos expériences passées.

C'est assez fascinant qu'un concept aussi abstrait qu'un souvenir dépende si étroitement d'un support aussi concret, intelligible et manipulable qu'une assemblée de neurones (joliment montré par Han et al., 2009) ayant subi des modifications synaptiques, formant ce qu'on appelle la « trace mnésique ». Si l'on est loin de comprendre « ce qui fait » un souvenir, les neurosciences en élucident petit à petit les mécanismes d'encodage (d'enregistrement de l'information), de consolidation (période durant laquelle la mémoire précédemment encodée est « stockée ») et de rappel (qui correspond à la restitution de l'information).

Nos souvenirs ne sont pas encodés sous leur forme définitive, ils subissent un processus dit de consolidation mnésique leur permettant d'être stabilisés et conservés dans le temps. La première partie de cette introduction générale présente ce processus, le définit et en détaille un modèle théorique argumenté par des données expérimentales. Elle finit avec la présentation d'un test comportemental adapté à l'étude de la consolidation mnésique, et que nous utiliserons tout du long (ou presque) de cette thèse.

S'il est bien établi que la distribution du flux sanguin cérébral est intimement liée à l'activité neuronale, peu de travaux concernent l'implication des vaisseaux sanguins cérébraux dans des tâches cognitives en-dehors de toute pathologie. La seconde partie de cette introduction met en lumière ces liens entre vaisseaux sanguins et activité neuronale puis entre vaisseaux sanguins et mémoire. Dans le domaine de la consolidation mnésique, le champ est encore inexploré, et c'est à cette charnière encore vierge de connaissances entre consolidation mnésique (spécialité dont relève Bruno Bontempi) et réseau vasculaire cérébral (spécialité dont relève Nathalie Macrez) que se situe cette thèse.

Les objectifs de mon travail seront précisés dans la dernière partie de l'introduction, qui détaille et commente le plan de ce manuscrit de thèse.

I. Le processus de consolidation mnésique

1) Le cas du patient H.M. : une introduction aux différents systèmes de mémoire et au concept de consolidation mnésique

En 1953, entre les mains du Dr. Scoville, le patient H.M. subit une ablation bilatérale de la partie antérieure du lobe temporal médian (incluant l'hippocampe) dans le but de retirer des foyers épileptiques qui le plongeaient dans des crises sévères et répétées. Cette intervention chirurgicale, bien qu'ayant éradiqué les crises d'épilepsie de H.M., lui laissa de graves déficits mnésiques, alors que ses autres aptitudes cognitives et perceptives étaient intactes. Les travaux de Brenda Milner, qui suivit H.M. pendant trente ans, firent progresser de façon spectaculaire le champ des neurosciences touchant à la mémoire (pour une revue, voir Tulving, 1972 ou Corkin, 1984).

H.M. présentait une **amnésie antérograde**, autrement dit une incapacité à former de nouveaux souvenirs. Sa seule façon de retenir une information était de la maintenir activement, continuellement en mémoire (dite à court terme) et tant que son attention n'était pas redirigée, mais cette stratégie ne s'avérait efficace que l'espace de quelques minutes. S'il ne pouvait former de nouvelles mémoires des faits et des événements qui rythmaient sa vie, il était en revanche capable de développer une nouvelle mémoire inconsciente (dite procédurale). Il pouvait par exemple progresser au fil des jours dans une tâche de dessin en miroir, bien qu'étant incapable de se souvenir qu'il avait déjà pris part à cet exercice les jours précédents.

Ce premier point met en évidence l'existence d'une dissociation anatomique entre mémoire à court terme (celle de H.M. était équivalente à celle de sujets sains) et mémoire à long terme, ainsi que l'existence de différents systèmes de mémoire reposant sur des régions cérébrales anatomiquement distinctes. Le nombre exact de systèmes mnésiques et les critères permettant de les différencier fait encore débat, cependant les neuroscientifiques s'accordent sur les principaux systèmes et les régions cérébrales qui les sous-tendent (figure 1).

La mémoire déclarative est tout simplement celle que nous désignons par le terme « mémoire » dans le langage courant, et regroupe d'une part la mémoire dite sémantique (mémoire des faits et des connaissances sur le monde) et d'autre part la mémoire dite épisodique qui permet de se souvenir des événements personnels. Il s'agit précisément du type de mémoire que H.M. n'était plus en mesure d'acquérir après l'opération. Elle est consciente et explicite, on peut la verbaliser, au contraire de la mémoire non déclarative qui est non consciente et implicite. Cette dernière résulte de l'expérience et

s'exprime dans la performance (comme pour la tâche du dessin en miroir). Dans cette thèse, nous nous intéresserons uniquement à une mémoire chez le rat présentant certaines caractéristiques de la mémoire déclarative ; nous reviendrons dessus dans la partie I.4 décrivant le test comportemental utilisé.

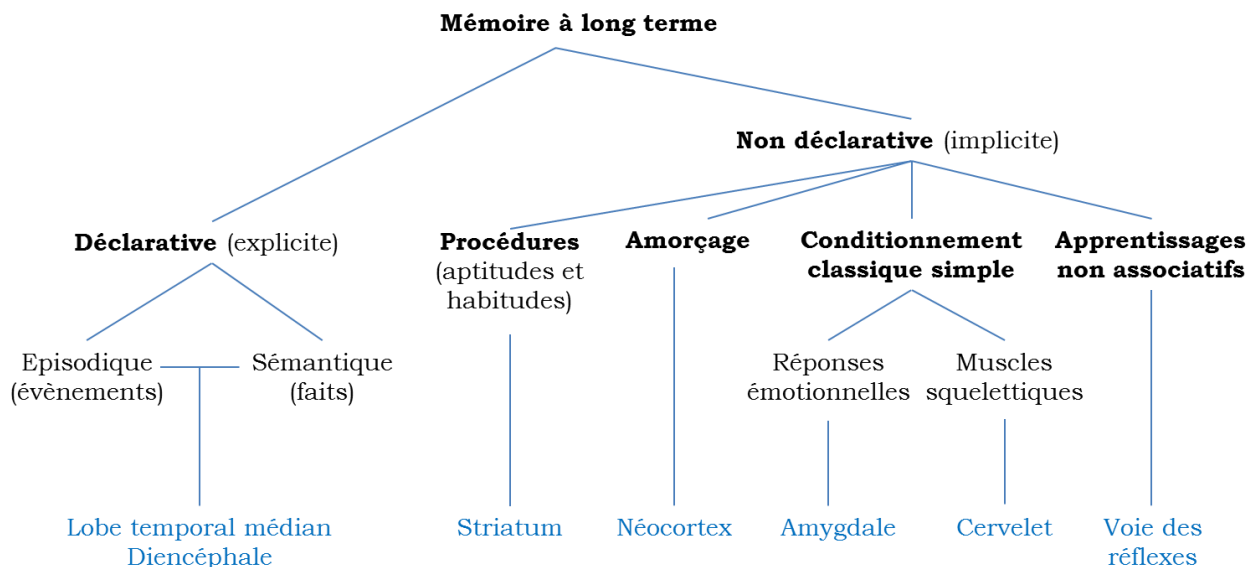


Figure 1 : Les différents systèmes de mémoire à long terme et les régions cérébrales sur lesquelles ils reposent. D'après Squire and Zola, 1996.

La démarche d'isoler différents systèmes de mémoire est pertinente et utile afin d'identifier de façon expérimentale les substrats anatomiques, physiologiques et moléculaires qui leur sont propres, cependant il ne faut pas perdre de vue qu'il ne s'agit pas d'entités psychologiques et biologiques distinctes : ces systèmes interagissent (Kim and Baxter, 2001).

Revenons à H.M. : outre son amnésie antérograde, il présentait aussi une **amnésie rétrograde** qui va particulièrement nous intéresser ici, une incapacité à retrouver les souvenirs acquis avant l'opération sur une période d'environ 11 ans (Corkin, 2002). Cette amnésie était temporellement graduée : ses souvenirs anciens, datant de plus de 11 ans avant l'opération étaient préservés alors que les souvenirs plus récents lui étaient inaccessibles.

Ces données montrent que la région retirée au patient H.M. joue un rôle dans la formation de la mémoire déclarative mais qu'elle n'est pas le site de stockage définitif de la trace mnésique ancienne. Ainsi, une réorganisation à l'échelle des régions cérébrales permettrait la conservation de nos souvenirs dans le temps. Il s'agit ici de la clé de voûte de la théorie standard de la consolidation mnésique, qui a ensuite été appuyée par d'autres études de patients ayant subi des dommages du lobe temporal médian, ainsi que par des modèles de l'amnésie chez l'animal ; nous reviendrons dessus dans la

partie I.3. Tout d'abord, clarifions le terme de « consolidation mnésique » utilisé dans la littérature pour désigner deux concepts bien distincts.

2) Consolidation cellulaire et consolidation systémique

Müller et Pilzecker introduisirent en 1900 le terme de « consolidation », après avoir montré qu'une information récemment acquise était sensible à des distracteurs pendant un délai de quelques minutes. Ainsi, une information qui vient d'être encodée doit subir un processus de consolidation lui conférant une stabilité initiale (voir Lechner et al., 1999 pour une revue). Ce phénomène de **consolidation cellulaire** (ou synaptique) correspond à la création de nouvelles connexions synaptiques ou à la restructuration de synapses existantes, changements morphologiques qui se mettent en place au cours des premières heures suivant l'apprentissage (Squire and Kandel, 1999 ; Dudai, 2004, voir figure 2). Brièvement, lorsque les récepteurs NMDA à la synapse détectent une co-activité entre les neurones pré-synaptique et post-synaptique, ils s'activent et induisent une dépolarisation massive du neurone et une entrée de calcium, aboutissant à l'activation de cascades de transduction qui vont permettre le renforcement de la synapse (Wang et al., 2006).

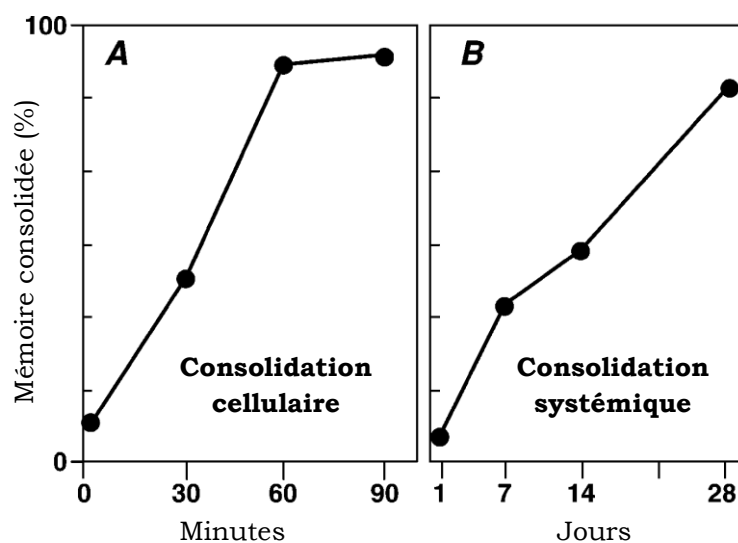


Figure 2 : Déroulement temporel des processus de consolidation mnésique. Le déroulement de la consolidation cellulaire (A) est déterminé en fonction de la sensibilité de la mémoire à des inhibiteurs de synthèse protéique et celui de la consolidation systémique (B) en fonction de sa sensibilité à une lésion de l'hippocampe. D'après Dudai, 2004.

La **consolidation systémique** s'opère sur un délai bien plus long (figure 2). Les pertes de mémoire des patients ayant subi des dommages du lobe temporal médian, qui concernaient préférentiellement les informations acquises récemment et épargnaient les souvenirs anciens (comme c'était le cas pour H.M.), ont été théorisées sous le nom de « loi de régression de Ribot ». Celle-ci met en évidence une réorganisation des circuits

cérébraux participant à la formation de la mémoire à long terme. Ce processus de consolidation systémique semble se produire avec des délais variables chez tous les mammifères et pour tous les systèmes de mémoire à long terme, aussi bien déclarative que non déclarative (Shadmehr and Holcomb, 1997). *Dans la suite de cette thèse, nous nous focaliserons sur ce phénomène de consolidation systémique de la mémoire, qui sera désigné simplement par le terme raccourci « consolidation mnésique ».*

3) La théorie standard de la consolidation mnésique

Nous avons vu que le lobe temporal médian, dont fait partie l'hippocampe, est impliqué dans la formation d'une mémoire déclarative, dans son rappel récent, mais qu'il ne constitue pas le site dépositaire de la trace mnésique ancienne. Selon la **théorie standard de la consolidation mnésique**, une interaction entre la région hippocampique et le néocortex conduirait à un désengagement progressif de l'hippocampe au profit d'une prise en charge de la mémoire ancienne par le néocortex, une fois le réseau neuronal cortical sous-tendant la trace mnésique stabilisé (Squire and Alvarez, 1995 ; Bontempi et al., 1999 ; Frankland and Bontempi, 2005, voir figure 3).

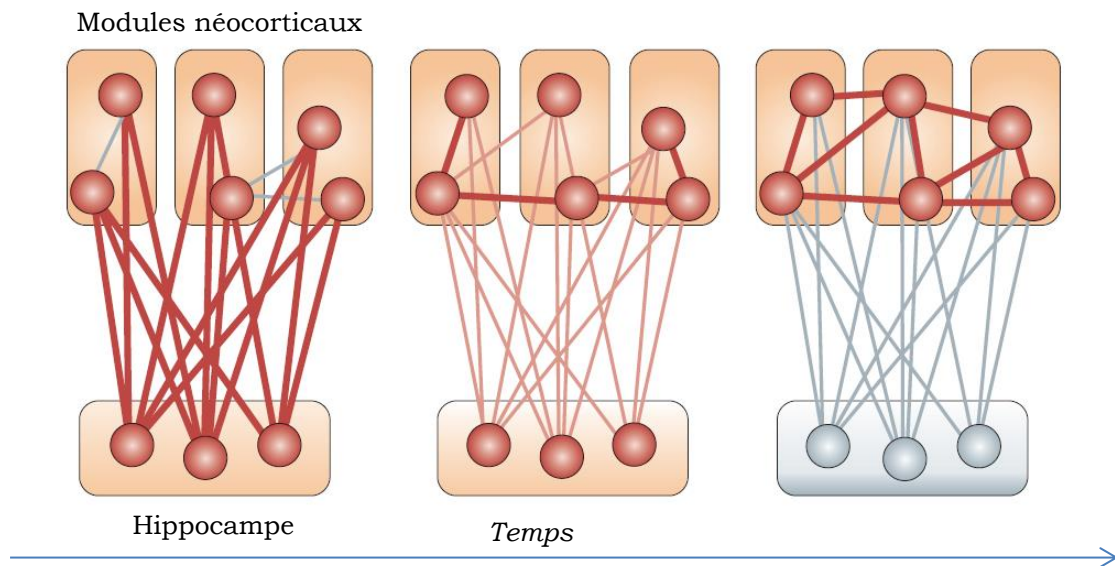


Figure 3 : Le modèle standard de la consolidation mnésique. L'hippocampe va rapidement intégrer l'information dont les différents aspects ont été encodés dans des aires corticales distribuées, afin d'en former une trace mnésique cohérente. Sous son impulsion, des réactivations successives du circuit hippocampo-cortical vont permettre le renforcement progressif des connexions cortico-corticales existantes ou la création de nouvelles connexions, jusqu'à ce que le cortex devienne capable à lui seul de sous-tendre le stockage et le rappel d'une information ancienne sans plus recourir à l'hippocampe, alors désengagé. D'après Frankland and Bontempi, 2005.

Les modifications des connexions au sein de l'hippocampe seraient rapides et transitoires, lui permettant d'assurer un « stockage » temporaire de la mémoire récente, alors qu'au sein du néocortex elles seraient lentes à se mettre en place mais perdureraient, permettant à ce dernier d'assurer un stockage stable et durable (McClelland et al., 1995). Le terme « stocker » apparaît abusif pour l'hippocampe, dont les neurones serviraient davantage à relier entre eux les détails des représentations mnésiques corticales distribuées qu'à stocker ces détails eux-mêmes et donc à maintenir une trace en mémoire (Eichenbaum, 2000). Ainsi il ne s'agit pas d'un transfert de la trace mnésique de l'hippocampe vers le néocortex, mais plutôt d'une réorganisation dans le temps qui résulterait en un stockage stable et durable au niveau cortical des mémoires anciennes, occasionnée par l'interaction transitoire entre hippocampe et cortex (Alvarez and Squire, 1994 ; Wittenberg et al., 2002).

Comment s'opère cette interaction, comment l'hippocampe va-t-il dialoguer avec les « bons » modules corticaux ? De récentes expériences menées au sein de l'équipe et sur le test comportemental que nous allons utiliser dans cette thèse ont permis d'avancer le concept d'un processus d'étiquetage des assemblées neuronales néocorticales activées au moment de l'encodage (Lesburguères et al., 2011). En parallèle, l'hippocampe va encoder et associer les « adresses » des circuits néocorticaux étiquetés, lui permettant par la suite de les réactiver spécifiquement.

Ces réactivations coordonnées se produiraient au cours de périodes dites « off-line » de repos ou de sommeil, au cours desquelles l'hippocampe et le néocortex ne seraient pas continuellement impliqués dans le traitement de stimuli environnants (Marr, 1971 ; Sejnowski, 1995). Durant la phase de sommeil à ondes lentes ou plus rarement au cours du sommeil paradoxal, certains patterns d'activité hippocampique induits lors d'apprentissages antérieurs sont rejoués, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (Wilson and McNaughton, 1994 ; Peigneux et al., 2004), et ce phénomène de « replays » se produit aussi au niveau du néocortex de façon concomitante (Qin et al., 1997 ; Huber et al., 2004 ; Ribeiro et al., 2004). Le lien causal entre « replays » et performance mnésique a été étayé par une étude d'imagerie fonctionnelle chez l'Homme montrant que la réexposition à un indice olfactif présent lors de l'apprentissage (une odeur de rose) au cours du sommeil à ondes lentes induit une réactivation spécifique de l'hippocampe associée à une amélioration de la performance dans un test de mémoire déclarative dépendante de l'hippocampe (Rasch et al., 2007).

La théorie standard de la consolidation mnésique est appuyée par des études menées sur des patients amnésiques ainsi que par de nombreuses preuves expérimentales chez le rongeur et le primate, via des approches corrélatives (imagerie cérébrale, marqueurs

d'activité neuronale) et invasives (lésions, inactivations), dans des tâches de mémoire spatiale ou non (pour revue voir Dudai, 2004 ; Squire et al., 2004 ; Frankland and Bontempi, 2005). Cependant cette théorie postule que toute mémoire déclarative finit par être corticalisée, ce qui reste débattu concernant leur aspect épisodique.

Se présentant comme un modèle alternatif, la **théorie des cartes cognitives** découle de la découverte des cellules de lieu dans l'hippocampe (O'Keefe and Nadel, 1978) et prédit que tout dommage hippocampique va altérer la rétention et le rappel de mémoires spatiales et épisodiques (dépendantes du contexte) quel que soit leur âge, l'hippocampe étant nécessaire à la représentation par l'animal de l'environnement dans lequel il évolue. Autre approche alternative, la **théorie des traces multiples** réunit des caractéristiques des deux modèles précédemment décrits. Elle stipule qu'une mémoire épisodique, définie par un contexte spatio-temporel précis, nécessiterait toujours l'intégrité de la région hippocampique lors de son rappel, et serait ré-encodée à chaque rappel (pour revue voir Moscovitch et al., 2005).

Le test comportemental que nous utilisons dans cette thèse (détaillé dans la partie suivante) induit une mémoire de type déclaratif et non spatiale pour laquelle l'hippocampe est désengagé à long terme (Clark et al., 2002 ; Lesburguères et al., 2011). Ainsi, on ne se situe pas à un point de divergence entre ces différents modèles théoriques.

4) Le test de Transmission Sociale de Préférence Alimentaire (TSPA)

Contrairement à la plupart des tests comportementaux modélisant la mémoire chez le rongeur en les faisant participer à des paradigmes « artificiels » spécialement conçus pour l'expérimentation, la tâche de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA) repose sur un comportement inné du rongeur mettant en jeu une mémoire « naturelle ».

4.1 – Principes éthologiques

Les rongeurs ont naturellement tendance à préférer une nourriture familière à une nourriture qui leur est inconnue. Ainsi, lorsqu'un animal est initialement pré-exposé à une nouvelle nourriture qu'il va pouvoir sentir et goûter, il va ensuite choisir préférentiellement cette dernière devenue familière plutôt qu'une autre nouvelle nourriture (Posadas-Andrews and Roper, 1983). Cependant cet effet de familiarité est peu robuste et ne perdure pas dans le temps.

Dans une colonie de rats, les **interactions sociales** sont d'une importance majeure pour que les membres de la colonie se renseignent quant aux endroits où trouver de la

nourriture propre à être consommée, ainsi qu'aux substances toxiques à éviter. Certains rats adultes jouent un rôle particulier de « goûteurs », et sont les plus sollicités lors de l'apparition d'une nouvelle nourriture au sein de la colonie (un aspect très bien illustré au début du film « Ratatouille »). Durant une vingtaine d'années, Galef et ses collaborateurs ont largement étudié les différents paramètres permettant et modulant cet échange d'informations sur la prise alimentaire. Ils ont montré qu'une interaction sociale d'environ trente minutes produisait une préférence durable (une semaine plus tard) pour la nourriture devenue familière lors de l'interaction, alors qu'une simple exposition à la nourriture seule, non transmise par un congénère, n'induisait aucune préférence alimentaire (Galef et al., 1985). Ainsi, la présence d'un congénère est essentielle pour la formation d'une préférence pour une nourriture rendue plus attractive, plus sûre, et cette préférence perdure dans le temps (Galef and Wigmore, 1983 ; Galef, 2003). Cela a conduit à imaginer le test de mémoire suivant réalisable en laboratoire, où les rats dits « démonstrateurs » jouent le rôle des goûteurs (figure 4).

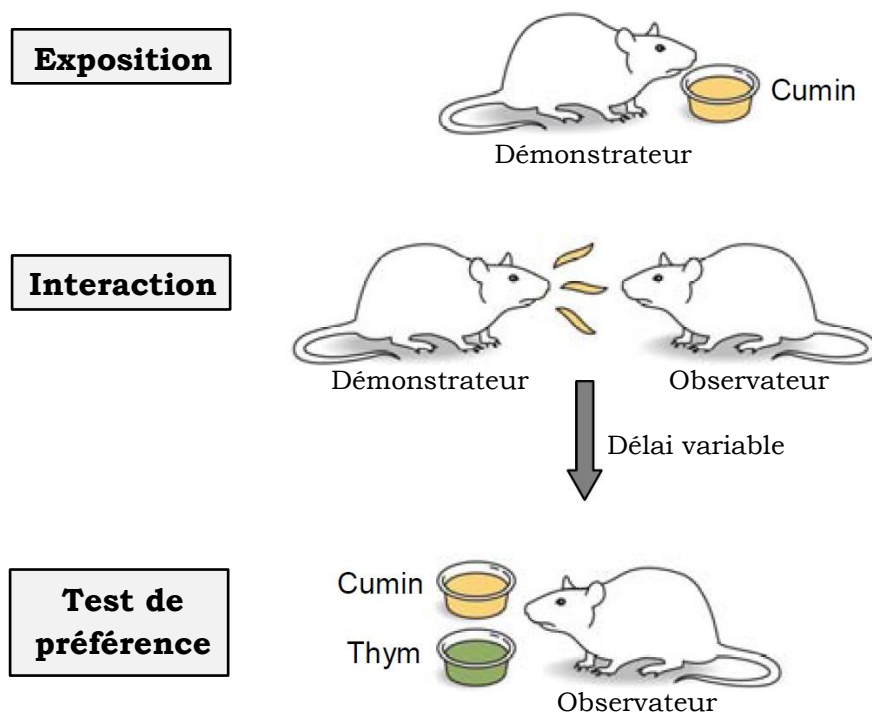


Figure 4 : Déroulement du test de TSPA. Durant la phase d'exposition, un rat démonstrateur mange tout d'abord de la nourriture aromatisée au cumin, immédiatement avant d'interagir avec le rat observateur. Durant cette interaction sociale, l'observateur encode une nouvelle mémoire olfactive associative (sur laquelle nous reviendrons). Lors du test de préférence, l'observateur est soumis à un choix entre l'odeur devenue familière (le cumin) et une odeur nouvelle (le thym). Il exprime la préférence alimentaire acquise lors de l'interaction en mangeant majoritairement de la nourriture aromatisée au cumin. Le protocole que nous avons utilisé est présenté en détail dans la partie « Matériels et méthodes ». D'après Lesburguères et al., 2011.

Cette préférence alimentaire ne va se maintenir que si la nourriture consommée par le démonstrateur est nouvelle (Galef et al., 1985). Ce qui pousse à être particulièrement précautionneux en réalisant ce test, afin de ne pas contaminer les salles abritant de futurs rats observateurs... Aussi, lorsque la nourriture consommée par les démonstrateurs est difficile à ingérer ou n'est pas intéressante d'un point de vue nutritif, la préférence alimentaire disparaît rapidement (Galef and Whiskin, 1998), suggérant que les rats utilisent la TSPA afin d'incorporer de nouvelles nourritures dans leur répertoire alimentaire, mais uniquement lorsque cela fait sens.

Que démontre le démonstrateur ? L'équipe de Galef a fait interagir les observateurs avec différents types de démonstrateurs : des normaux, des anesthésiés juste après avoir consommé la nourriture aromatisée et des rats factices enduits de nourriture aromatisée. Ces expériences ont montré que la présence d'un congénère est cruciale : en effet, les démonstrateurs anesthésiés induisent aussi une préférence alimentaire, ce qui n'est pas le cas des rats factices (Galef et al., 1985). Ces mêmes auteurs ont ensuite cherché à savoir ce qui, dans l'information portée par le démonstrateur, influençait le comportement de l'observateur. Il s'est avéré que certains éléments volatiles de l'haleine des rats, notamment le disulfure de carbone, étaient essentiels à la mise en place de la préférence alimentaire chez le rat observateur. En effet, des démonstrateurs factices enduits de nourriture aromatisée et de disulfure de carbone suffisent à induire une préférence alimentaire comparable à celle produite par de vrais démonstrateurs (Galef et al., 1988).

De façon intéressante, lorsqu'un rat interagit avec un démonstrateur connu et un démonstrateur inconnu, il a tendance à préférer ce que le démonstrateur inconnu a ingéré. Ce résultat est surprenant eu égard à la plupart des études portant sur les apprentissages sociaux, montrant que les individus adoptent préférentiellement le comportement de parents plutôt que d'inconnus. Cela s'explique par l'exploration olfactive décrite par Barnett (1963), pratique d'identification plus intense et prolongée lorsque les rats se retrouvent face à un congénère inconnu, ce qui semble bien être le cas aussi dans la tâche de TSPA (Galef and Whiskin, 2008). Ainsi, nous avons veillé à ne pas faire interagir les observateurs avec des démonstrateurs qui leur étaient connus.

4.2 – Caractérisation de la mémoire induite par l'interaction sociale

Pour un rat, savoir si une nourriture est comestible ou non doit être une information indépendante du contexte spatial, extrapolable en tous lieux. Ainsi, *la part spatiale de la mémoire induite par la TSPA apparaît négligeable* (Strupp and Levitsky, 1984 ; Alvarez et al., 2002). On pourra donc se concentrer sur le rôle de l'hippocampe dans la consolidation mnésique indépendamment de son rôle dans le traitement spatial.

De plus, le test de TSPA implique la formation d'une association entre l'odeur de la nourriture nouvelle et certains composés de l'haleine du démonstrateur (en particulier le disulfure de carbone) afin d'assimiler que celle-ci est sans danger, ainsi que la capacité d'exprimer cette mémoire de façon flexible (lors du test, seule l'odeur du cumin est présente et non le disulfure de carbone, et la situation du test est largement différente de la situation d'apprentissage en présence d'un congénère). La mise en relation de différents stimuli et l'utilisation flexible de la mémoire de ces associations dans des situations nouvelles sont des caractéristiques de la mémoire déclarative, dite aussi relationnelle (Eichenbaum, 2000). Ainsi, *la mémoire induite lors de la tâche de TSPA est une mémoire olfactive associative qui met en jeu des propriétés essentielles de la mémoire dite déclarative.*

Un point intéressant de ce test est la ponctualité de la phase d'apprentissage, qui correspond aux trente minutes d'interaction sociale, ce qui permet de facilement distinguer la phase d'encodage (l'interaction) de la phase de rétention (la période suivant l'interaction, modulable), ce qui n'est pas le cas d'autres tâches mnésiques requérant un apprentissage sur plusieurs heures/jours (le labyrinthe radiaire, par exemple).

Comme précisé auparavant, le temps nécessaire pour que le processus de consolidation mnésique soit achevé dépend aussi bien de l'espèce étudiée que du type de mémoire en jeu. Dans ce test, un délai de 30 jours a été montré comme suffisant pour que la mémoire olfactive associative soit consolidée au niveau cortical chez le rat (Clark et al., 2002 ; Lesburguères et al., 2011), délai auquel les rats ne présentent pas encore d'oubli significatif. De plus, il est établi que cette mémoire est initialement dépendante de l'hippocampe (et du subiculum) sur la base d'études lésionnelles (Bunsey and Eichenbaum, 1995 ; Winocur et al., 2001 ; Clark et al., 2002), d'inactivations transitoires (Lesburguères et al., 2011) et d'études corrélatives portant sur l'activation neuronale au cours du processus de consolidation mnésique (Ross and Eichenbaum, 2006 ; Lesburguères et al., 2011). Les approches lésionnelles irréversibles, en générant potentiellement des phénomènes de réorganisation et de compensation fonctionnelle, ne permettent pas de conclure quant aux structures assurant le stockage et le rappel de la mémoire ancienne, ni même si l'hippocampe lésé aurait pu être toujours impliqué dans le rappel de la mémoire ancienne en conditions normales. Les études d'imagerie cellulaire d'activation neuronale, combinées aux études d'inactivation transitoire, appuient le fait que *la tâche de TSPA induit bien une mémoire dépendante de l'hippocampe de façon transitoire (consolidée, indépendante de l'hippocampe dès 30 jours après l'interaction), conformément au modèle standard de la consolidation mnésique.*

Quelles sont les régions corticales impliquées dans la prise en charge de la mémoire ancienne induite par la tâche de TSPA ? L'étude d'imagerie cellulaire de Ross et Eichenbaum (2006) permet difficilement de conclure, leurs animaux témoins étant critiquables : ils ont également formé une mémoire olfactive associative, mais avec une autre odeur ; leur étude indique donc les structures impliquées dans le rappel mnésique d'une odeur spécifique. *Lorsque nous voudrions déterminer quels changements vasculaires sont induits par la formation, le stockage et le rappel d'une mémoire olfactive associative (il s'agit des 2 premiers chapitres d'approche corrélative), nous utiliserons un groupe de rats témoins différent : ils interagiront avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle, non aromatisée, et ne formeront donc pas de nouvelle mémoire olfactive associative.*

Les données d'imagerie cellulaire (utilisant la tâche de TSPA) obtenues en thèse par Edith Lesburguères révèlent un recrutement des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur dans le rappel de la mémoire ancienne (testée 30 jours après l'interaction) et une absence d'activation de ces structures lors du rappel de la mémoire récente (testée 1 jour après l'interaction), et montrent que le cortex pariétal ne présente d'activation spécifique à aucun de ces deux délais (Lesburguères et al., 2011). Ces données d'imagerie ont été corroborées par une étude d'inactivation transitoire, montrant une *implication fonctionnelle des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur dans la prise en charge de la mémoire ancienne, mais pas de la mémoire récente*. Le cortex cingulaire antérieur s'avère être impliqué dans la prise en charge de mémoires anciennes de natures variées dans des tâches spatiales ou non, aversives ou appétitives (Bontempi et al., 1999 ; Takehara et al., 2003 ; Frankland et al., 2004 ; Maviel et al., 2004 ; Texeira et al., 2006), laissant supposer qu'il agit de façon générique comme une structure intégratrice coordonnant le rappel à long terme de mémoires reposant sur des réseaux neuronaux corticaux distribués. Le cortex orbitofrontal reçoit des afférences d'aires primaires gustatives, visuelles et olfactives, entre autres du cortex piriforme (Price, 2007). Ce dernier est essentiel pour la formation d'associations avec une composante olfactive (Whishaw et al., 1992 ; Critchley and Rolls, 1996 ; Lipton et al., 1999), ce qui peut expliquer son recrutement dans la tâche de TSPA.

Enfin, on peut suspecter l'implication du cortex piriforme dans l'encodage de l'odeur (Sánchez-Andrade et al., 2005). Il devrait donc être impliqué dans le rappel de la mémoire récente aussi bien que de la mémoire ancienne dans la tâche de TSPA. Nous ne l'avons cependant pas étudié dans cette thèse, dans laquelle nous nous sommes concentrés sur l'hippocampe, le cortex orbitofrontal et le cortex cingulaire antérieur.

II. Vaisseaux sanguins cérébraux et fonctionnement du cerveau

1) Généralités sur le réseau vasculaire cérébral

Bien que consommant environ 20% des réserves métaboliques du corps entier, le cerveau a une capacité très limitée à stocker l'énergie. Ainsi, il est l'organe le plus dépendant de son réseau vasculaire (figure 5) qui lui apporte oxygène et nutriments. En effet, en cas d'interruption du flux sanguin cérébral, le cerveau cesse de fonctionner dans les secondes qui suivent et des dommages irréversibles sont occasionnés en quelques minutes à peine (Hossmann, 1994).

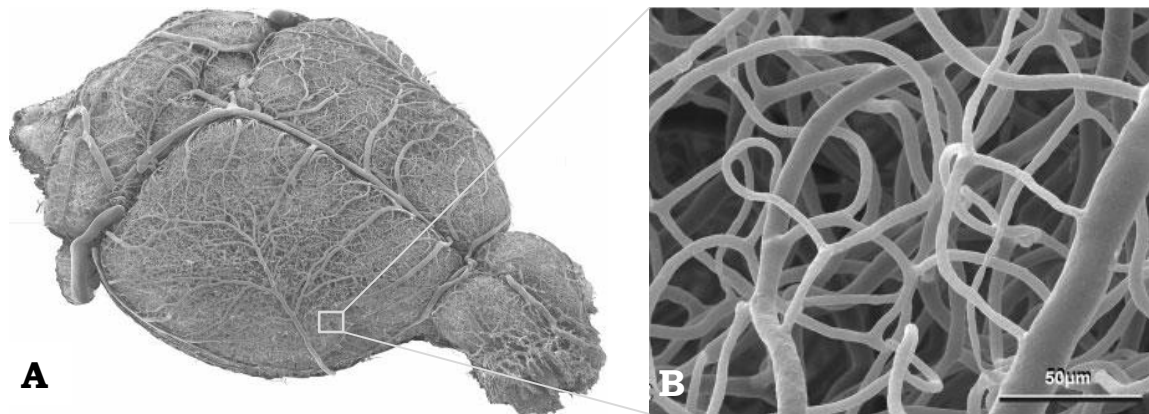


Figure 5 : Reconstruction du réseau vasculaire d'un cerveau de souris, **(A)** vue d'ensemble et **(B)** zoom sur une zone du cortex. Le volume sanguin a été remplacé par une résine, le tissu environnant dégradé puis l'architecture du réseau vasculaire imagée par microscopie à balayage électronique. D'après Krucker et al., 2006.

Afin de palier à cette fragilité, deux mécanismes principaux assurent une perfusion adéquate du cerveau. L'**autorégulation** compense les fluctuations normales de la pression artérielle, assurant un flux sanguin cérébral quasiment constant tant que celle-ci reste dans la fourchette de 50 à 150mmHg : pour cela, les artères cérébrales se contractent lorsque la pression artérielle augmente et se dilatent lorsque celle-ci diminue (Pires et al., 2013, voir figure 6). Le second mécanisme, qualifié d'**hyperhémie fonctionnelle**, régule la distribution locale du flux sanguin cérébral en fonction de l'activité des différentes régions du cerveau, de sorte que le flux sanguin dans une région donnée augmente lorsque l'activité de cette région augmente, assurant un apport adapté d'oxygène et de nutriments, ainsi que le « nettoyage » des sous-produits de l'activité neuronale. Dans le cadre de cette thèse portant sur l'implication fonctionnelle du réseau vasculaire cérébral dans un processus cognitif, la consolidation mnésique, *c'est seulement le mécanisme d'adaptation locale du flux sanguin à l'activité des régions*

cérébrales, autrement dit l'hyperhémie fonctionnelle, qui va nous concerner. Nous reviendrons plus en détail sur ce mécanisme et ses acteurs dans la partie suivante.

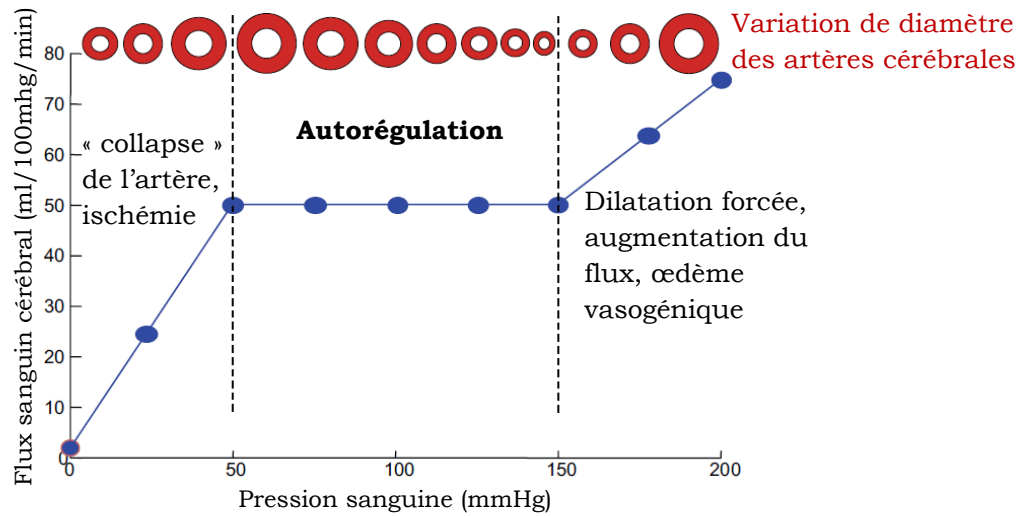


Figure 6 : Principe du mécanisme d'autorégulation. D'après Pires et al., 2013.

Voyons tout d'abord de plus près la morphologie du réseau vasculaire cérébral. Les images qui suivent, obtenues par résonance magnétique, ont été réalisées à l'aide de cerveaux de souris (Dorr et al., 2007). Pour autant, celles-ci donnent une bonne idée de la localisation des principales artères cérébrales partant du polygone de Willis (figure 7), un système de suppléance vasculaire essentiel à l'hyperhémie fonctionnelle, et dont la structure est hautement conservée entre rats et souris (Wilson and Reeder, 2006). Ces artères cérébrales irriguent spécifiquement différents territoires cérébraux (figure 8).

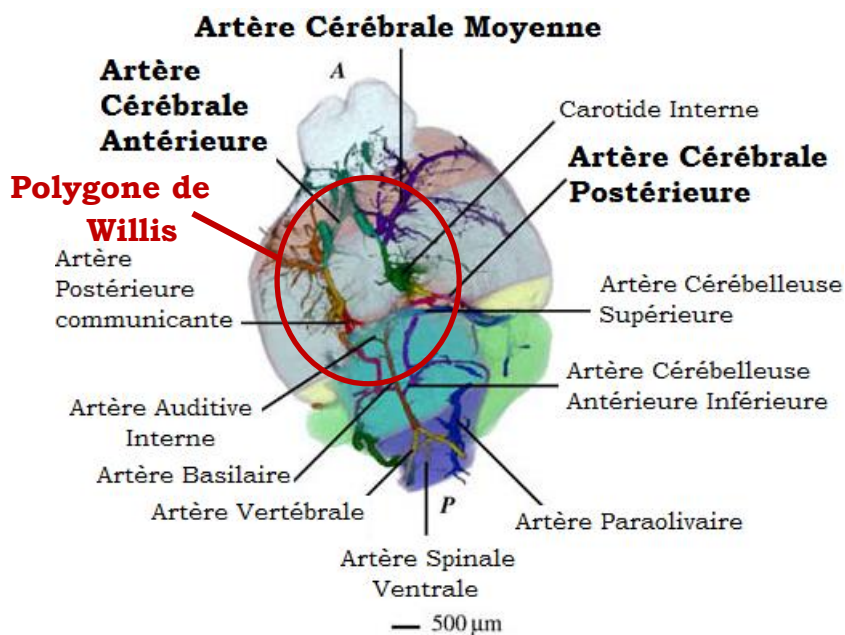


Figure 7 : Vue de la base d'un cerveau de souris. Partant du polygone de Willis, les artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures irriguent les territoires corticaux et sous-corticaux. Le détail des artères qui vont nous intéresser se trouve en figure 8. D'après Dorr et al., 2007.

Dans cette thèse, nous nous focaliserons sur les artères cérébrales antérieures (ACA), irriguant les régions corticales frontales dont les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur (figure 8), impliqués dans la prise en charge de la mémoire ancienne induite par la TSPA (voir partie I.4), et sur les artères cérébrales postérieures (ACP) irriguant principalement l'hippocampe (figure 8), impliqué dans la prise en charge de la mémoire récente.

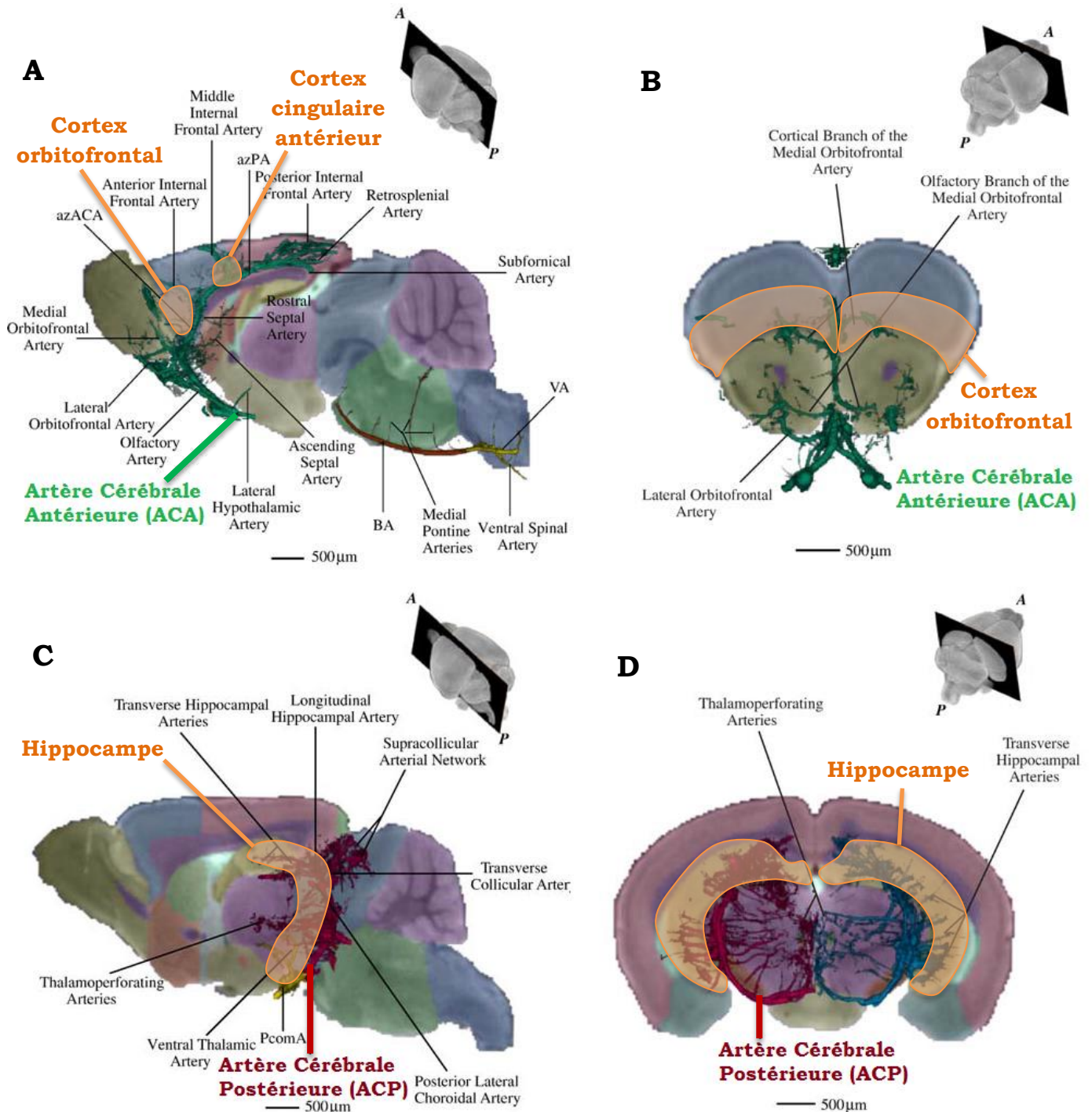


Figure 8 : Vues d'une coupe (A) sagittale et (B) frontale montrant les deux ACA et leurs subdivisions ; et d'une coupe (C) sagittale et (D) frontale montrant les deux ACP et leurs subdivisions. D'après Dorr et al., 2007.

A l'image du polygone de Willis, le réseau vasculaire cérébral est fondamentalement redondant. Au niveau du cortex cérébral, les artères cérébrales postérieures, moyennes et antérieures se ramifient pour former leur réseau d'artérioles communicantes à la surface de leur territoire cortical, chez le rat aussi bien que chez l'homme (Nonaka et al., 2003). Ces réseaux d'artérioles de surface (dites artères piales) sont fortement interconnectés, permettant ainsi une redistribution du flux sanguin en cas d'occlusion de l'une d'elles, comme cela a été montré par microscopie biphotonique chez le rat (Schaffer et al., 2006). De plus, les réseaux d'artérioles de surface de deux artères cérébrales voisines sont connectés entre eux via des artères piales appelées anastomoses leptoméningées (Brozici et al., 2003), permettant ainsi des phénomènes de compensation fonctionnelle, notamment en cas d'occlusion d'une artère cérébrale (Coyle, 1982 ; Lay, 2011).

De ce réseau partent à leur tour des artérioles plongeant à l'intérieur du cortex et connectées au réseau de capillaires sanguins (Iadecola, 2004, voir figure 9). Ces artérioles pénétrantes irriguent un territoire d'environ 500µm de diamètre, associé au tissu cérébral endommagé suite à leur occlusion (Nishimura et al., 2007). Ainsi apparaissent des « unités vasculaires », centrées autour d'une artériole pénétrante, elle-même associée à une ou deux veinules voisines ; ces unités vasculaires restent largement communicantes grâce à des possibilités de distribution sanguine collatérale via le réseau de capillaires sanguins (Guibert et al., 2012). Cela souligne à ce niveau encore du réseau vasculaire cortical des capacités compensatoires, qui sont d'autant plus grandes que le domaine cortical concerné est profond (Guibert et al., 2012). Ces dernières considérations sont basées sur des simulations de « perfusion passive » sans prendre en compte les variations de diamètre des vaisseaux, contrôlées en partie par le mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle.

2) Unité neurovasculaire et hyperhémie fonctionnelle

Neurones, astrocytes et vaisseaux sanguins constituent « l'unité neurovasculaire », un concept né des études portant sur leurs interactions en conditions normales ou en cas de lésion. Par leur action coordonnée, ces différentes cellules génèrent, coordonnent et transduisent les signaux moléculaires responsables des variations du flux sanguin (pour revues voir Iadecola, 2004 et Muoio et al., 2014).

La signalisation synaptique génère la production de nombreux médiateurs vasoactifs. Certains neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, le GABA, les catécholamines sont eux-mêmes vasoactifs ; d'autres tels que le glutamate ne le sont pas mais stimulent la

production de puissants vasodilatateurs tel que l'oxyde nitrique (NO). De plus, l'augmentation du métabolisme de l'ATP associé à la transmission synaptique génère la production d'adénosine, potentiellement vasodilatatrice. Il apparaît que ces multiples médiateurs coopèrent dans la régulation du flux sanguin cérébral : ainsi, bloquer l'un d'eux n'atténue que partiellement la réponse vasculaire, et l'intensité de cet effet varie selon les régions cérébrales considérées.

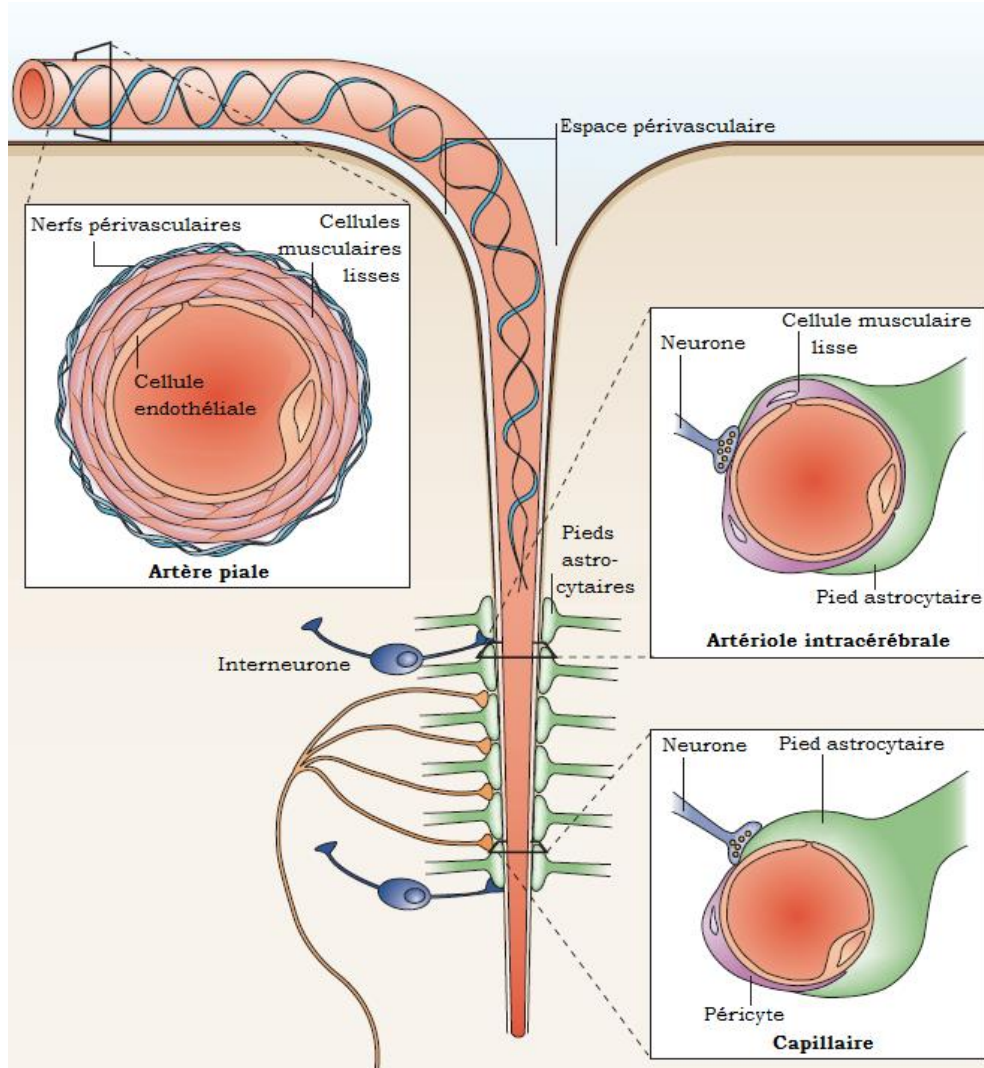


Figure 9 : L'unité neurovasculaire. Les artères piales sont séparées du cerveau par l'espace périvasculaire, qui disparaît avec la pénétration des artérioles dans le cerveau, permettant le contact direct des pieds astrocytaires et de terminaisons neuronales avec leur membrane basale. Les cellules endothéliales cérébrales, non fenestrées et interconnectées via des jonctions serrées, constituent la barrière hémato-encéphalique. D'après Iadecola, 2004.

La modulation du flux sanguin est de plus liée au niveau d'oxygène au sein de l'environnement neuronal : ainsi, l'hypoxie induit une augmentation du lactate extracellulaire et de l'adénosine entourant l'unité neurovasculaire, ce qui réduit la production et l'action des prostaglandines, promouvant une vasodilatation (Lee et al.,

2011), alors que la situation inverse favorise la vasoconstriction. De plus, la modulation du ratio lactate/pyruvate via une administration systémique de ces molécules a un effet sur l'augmentation du flux sanguin générée par l'activation des neurones des cortex somatosensoriel et visuel chez l'Homme aussi bien que chez le rongeur. Ce ratio étant proportionnel au ratio NADH/NAD⁺ cytosolique qui reflète l'état redox et l'énergie de la cellule, l'hypothèse d'un lien entre l'état énergétique des cellules et le mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle a été émise (Ido et al., 2001). Les caractéristiques intrinsèques des cellules musculaires lisses, des péricytes ainsi que des cellules endothéliales sont ainsi à même d'influencer aussi la modulation du flux sanguin.

Le fait que l'augmentation du flux sanguin soit si rapide (moins d'une seconde dans le néocortex, voir Norup Nielsen and Lauritzen, 2001) et locale (moins de 100µm dans le bulbe olfactif, voir Chaigneau et al., 2003) s'explique par l'intervention des interneurones et des astrocytes ayant des terminaisons en contact avec les vaisseaux dans la communication du besoin d'augmenter le flux sanguin localement. Dans ce schéma, les neurones apparaissent comme les pacemakers de l'unité neurovasculaire (Banerjee and Bhat, 2007) et communiquent leurs besoins aux vaisseaux via les astrocytes et les interneurones avec lesquels ils établissent des synapses. Ainsi, sur tranches cérébrales, le glutamate produit par l'activité neuronale génère des vagues calciques astrocytaires qui atteignent leurs pieds en contact avec les cellules contractiles du compartiment vasculaire et y génèrent une vasodilatation (Zonta et al., 2003). La capacité des vagues calciques astrocytaires de moduler le diamètre des vaisseaux que leurs pieds entourent a de plus été montrée *in vivo* (Mulligan and MacVicar, 2004) et est dépendante de la concentration en oxygène dans l'espace extracellulaire. Ainsi, en faible concentration en oxygène, une vague calcique astrocytaire provoque la dilatation des vaisseaux, alors qu'en forte concentration en oxygène ce même phénomène provoque la contraction des vaisseaux (Attwell et al., 2010). Ces vagues calciques astrocytaires ne sont cependant pas toujours corrélées à une augmentation de l'activité neuronale (Gordon et al., 2007). Concernant les interneurones, leur production de NO joue un rôle dans la modulation du flux sanguin, pouvant générer une vasodilatation à concentration modérée et une vasoconstriction à forte concentration (Duchemin et al., 2012).

Localement, les péricytes (sur les capillaires, voir Peppiatt et al., 2006) et les cellules musculaires lisses (sur les artérioles) sont capables de moduler le diamètre des vaisseaux qu'ils entourent. Cependant, pour que les variations du flux sanguin soient efficaces, des ajustements vasculaires se produisent aussi au sein des artères piales en amont (figure 10). La propagation de la vasodilatation en amont se ferait au sein de la paroi vasculaire, via les jonctions communicantes entre cellules endothéliales et entre

cellules musculaires lisses. La libération de vasodilatateurs par l'endothélium des artères piales, en réponse à une augmentation du débit sanguin dans ces vaisseaux induite par la dilatation des capillaires en aval, est un autre mécanisme expliquant la propagation en amont et jusqu'aux artères piales d'une vasodilatation des capillaires et des artérioles intracérébrales. Les cellules endothéliales sont en effet elles-mêmes capables de libérer aussi bien des vasodilatateurs (NO) que des vasoconstricteurs (endothéline, thromboxane). Eclaircissant un point polémique concernant la capacité des péricytes (entourant les capillaires sanguins) à moduler le flux sanguin, Hall et al. (2014) montrent que le glutamate conduit à la dilatation des capillaires via une relaxation active des péricytes, que cette dilatation des capillaires précède celle des artérioles en amont après des stimuli sensoriels, et qu'elle serait responsable d'environ 84% de l'augmentation du flux sanguin.

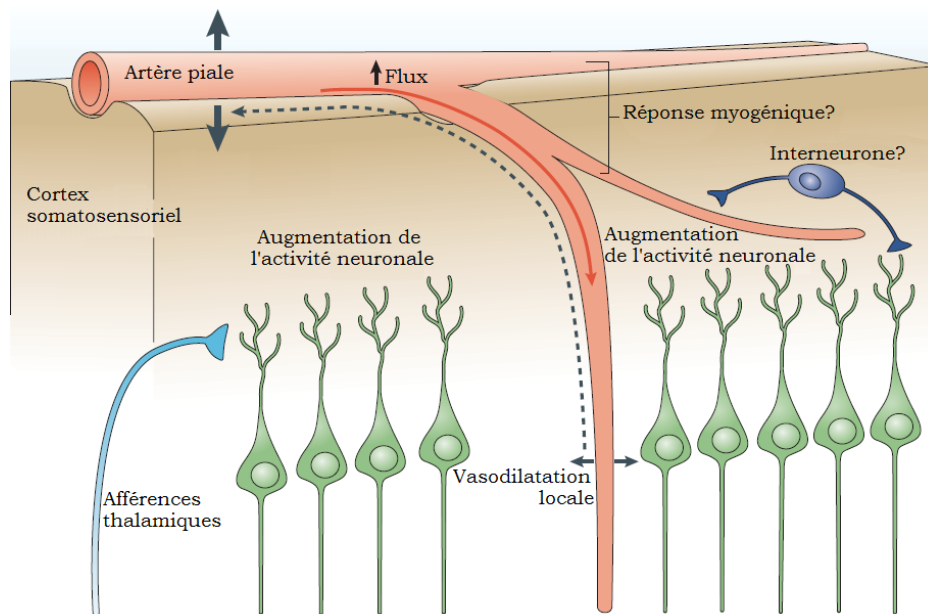


Figure 10 : Propagation de la réponse vasculaire suite à une activation du cortex somatosensoriel. Une réponse myogénique des vaisseaux irriguant des territoires neuronaux non activés ainsi qu'un concours possible des interneurons permettraient à l'augmentation du flux d'être ciblée vers les régions activées. D'après Iadecola, 2004.

Les variations du flux sanguin cérébral sont-elles toujours une conséquence de l'activité neuronale, ou bien pourraient-elles elles-mêmes faciliter l'activation d'une région cérébrale ? Sirotin and Das (2009) ont montré que dans le cortex primaire visuel du singe éveillé, le signal hémodynamique comprend deux composantes bien distinctes. L'une d'elles peut être prédite par l'activité neuronale générée par des stimuli visuels ; l'autre n'est au contraire pas corrélée à ces paramètres et semble correspondre à un mécanisme préparatoire permettant un apport sanguin supplémentaire au niveau du cortex, anticipant le début d'une tâche attendue qui aurait été répétée à intervalles de

temps réguliers. Ainsi, le réseau vasculaire cérébral peut être conditionné à une réponse, et anticiper une activité neuronale attendue.

3) Vaisseaux sanguins cérébraux et mémoire

Sans surprise, des dommages occasionnés à l'unité neurovasculaire ont de graves conséquences (Xing et al, 2012). Des atteintes à cette unité fonctionnelle ont été reportées dans des cas aigus de lésion cérébrale traumatique (Armstead and Raghupathi, 2011), d'accident vasculaire cérébral (Bastide et al., 2007), ainsi que dans des problèmes chroniques tels que les démences (Carmeliet, 2003) et la maladie d'Alzheimer (Sagare et al., 2012). Le rôle spécifique des déficiences vasculaires dans les détériorations cognitives dues à ces atteintes reste à préciser ; pour autant il apparaît clairement qu'une dysfonction vasculaire peut avoir un impact sur la cognition. Cela semble être le cas dans la démence vasculaire (Engelhardt et al., 2007), dans l'hypertension (Carnevale et al., 2012), dans la sténose carotidienne (Silvestrini et al., 2009) et dans la maladie d'Alzheimer (Dotti and De Strooper, 2009).

De façon intéressante, dans le domaine de la mémoire, quelques études montrent qu'une action sur le réseau vasculaire peut restaurer au moins en partie des performances mnésiques altérées par une pathologie. Ainsi, une administration systémique de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) améliore les performances mnésiques de modèles murins de la maladie d'Alzheimer dans un test de piscine de Morris, possiblement en stimulant l'angiogenèse cérébrale, contrecarrant ainsi la réduction du flux sanguin cérébral dont sont victimes les malades Alzheimer (Wang et al., 2011). A cette étude fait écho celle de Religa et al. (2013), montrant que la surexpression de VEGF neuronal restaure les performances mnésiques de modèles murins de la maladie d'Alzheimer dans un test de labyrinthe en T, possiblement en promouvant la survie des cellules vasculaires cérébrales dont cette pathologie provoque l'apoptose. De plus, la stimulation de l'expression du VEGF et du récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2) via une injection systémique de DL-3-n-Butylphthalide (Zhang et al., 2012) ou d'érythropoïétine (Xiong et al., 2011) améliore les performances mnésiques dans un test de piscine de Morris de rats ischémiés (Zhang et al., 2012) ou de rats ayant subi une lésion cérébrale traumatique (Xiong et al., 2011) respectivement. Enfin, l'administration de statines restaure les performances de modèles murins de la maladie d'Alzheimer dans un test de piscine de Morris, et cet effet pourrait passer par la restauration de la réactivité cérébrovasculaire de ces souris (Tong et al., 2012). Ces différentes études se situent sur un versant pathologique de la question. Très peu de travaux portent sur une possible implication fonctionnelle du réseau vasculaire cérébral

dans des processus mnésiques (et même cognitifs, plus généralement) en-dehors de toute pathologie.

Dès 1987, Black et al. ont mis en évidence que lorsqu'ils sont élevés dans un environnement enrichi, où les jouets sont régulièrement changés et en compagnie de congénères, le cortex occipital des rats est plus vascularisé que lorsqu'ils sont élevés dans leurs cages habituelles (Black et al., 1987). Les auteurs suggèrent qu'une angiogenèse (autrement dit une création de nouveaux capillaires sanguins) s'est mise en place pour compenser les demandes métaboliques accrues des neurones, sachant qu'il avait été montré auparavant que ceux-ci établissent plus de contacts synaptiques et ont de plus longues dendrites dans de telles conditions. Wallace et al. (2011) montrent de plus que dans un tel contexte de milieu enrichi, les croissances neuronale et astrocytaire semblent précéder l'angiogenèse : ainsi, 4 jours d'environnement enrichi suffisent à augmenter l'épaisseur du cortex visuel et la densité de prolongements astrocytaires, alors que l'angiogenèse n'est pas encore détectable à un tel délai, 10 jours dans ces conditions sont nécessaires pour pouvoir la détecter clairement (ce qui n'exclut pas qu'une angiogenèse localisée et subtile se mette en place plus précocement). Ils suggèrent que le réseau vasculaire pourrait ainsi limiter ou au contraire permettre des phénomènes de plasticité au sein du cerveau. De plus, les travaux de Palmer et al. (2000) montrent que la neurogenèse est associée physiquement et temporellement à la croissance vasculaire au sein de niches angiogéniques. Le fait que les processus mnésiques dépendent de phénomènes de plasticité neuronale est une idée ancienne (Greenough and Bailey, 1988), ces résultats suggèrent de plus que *cette plasticité neuronale pourrait être tributaire d'une certaine plasticité vasculaire.*

Reprenant cette idée, Kerr et al. (2010) montrent qu'une injection systémique d'un anti-angiogénique ciblant VEGFR-2 perturbe l'apprentissage et la mémoire ancienne dans un test de piscine de Morris : en effet, leur acquisition de la tâche est retardée et leur mémoire testée 30 jours plus tard est altérée. Leur étude est critiquable : la drogue n'a aucun effet observable sur la densité vasculaire hippocampique déterminée en fin de test et aucun corrélât vasculaire n'est ainsi associé aux résultats comportementaux ; on ne peut écarter un effet de l'anti-angiogénique sur l'état général du rat, les injections systémiques n'étant pas doublées d'injections intracérébrales ; enfin, aucune autre drogue ciblant une autre voie de signalisation impliquée dans l'angiogenèse n'est utilisée, laissant planer un doute sur la spécificité de l'effet observé, d'autant plus qu'aucun argument ne permet d'écarter l'hypothèse que cette drogue pourrait passer la barrière hémato-encéphalique et ainsi impacter aussi sur le compartiment neuronal. *Le développement d'outils permettant de cibler spécifiquement l'angiogenèse sans impacter sur le fonctionnement d'autres acteurs cérébraux a d'ailleurs été l'un des défis de cette*

thèse. L'étude de Kerr et al. a cependant le mérite d'avancer une idée originale et intéressante : l'acquisition d'une nouvelle mémoire, sa rétention et son rappel à long terme pourraient être tributaires de changements vasculaires *structuraux* et pas seulement dynamiques.

Des changements vasculaires structuraux sont-ils inattendus au sein du cerveau adulte sain ? Utilisant une technique d'imagerie biphotonique *in vivo* chez la souris, Harb et al. (2013) ont réalisé un suivi des changements structuraux de la microvasculature d'une période postnatale précoce jusqu'à un stade avancé du vieillissement. Cela leur a permis de mettre en évidence que le remodelage microvasculaire décline au cours de la vie de la souris (figure 11A), mais que même chez l'adulte quelques éliminations et formations vasculaires persistent, représentant peut-être une réponse à des changements métaboliques mineurs permettant de maintenir les neurones dans un environnement fondamentalement stable. Contrairement au modelage vasculaire embryonnaire riche en pousses de nouveaux vaisseaux et donc en prolifération de cellules endothéliales, au cours de la période postnatale, beaucoup de nouveaux embranchements vasculaires sont formés par l'action d'une seule cellule, la « tip cell » qui étend ses prolongements cellulaires (figure 11B), conduisant à une augmentation de densité d'embranchements vasculaires sans prolifération cellulaire. Chez le jeune adulte, jusqu'à 3 mois, cette plasticité vasculaire est exacerbée par des conditions hypoxiques (10% d'oxygène pendant un mois), et la capacité de réponse à l'hypoxie se perd chez la souris plus âgée.

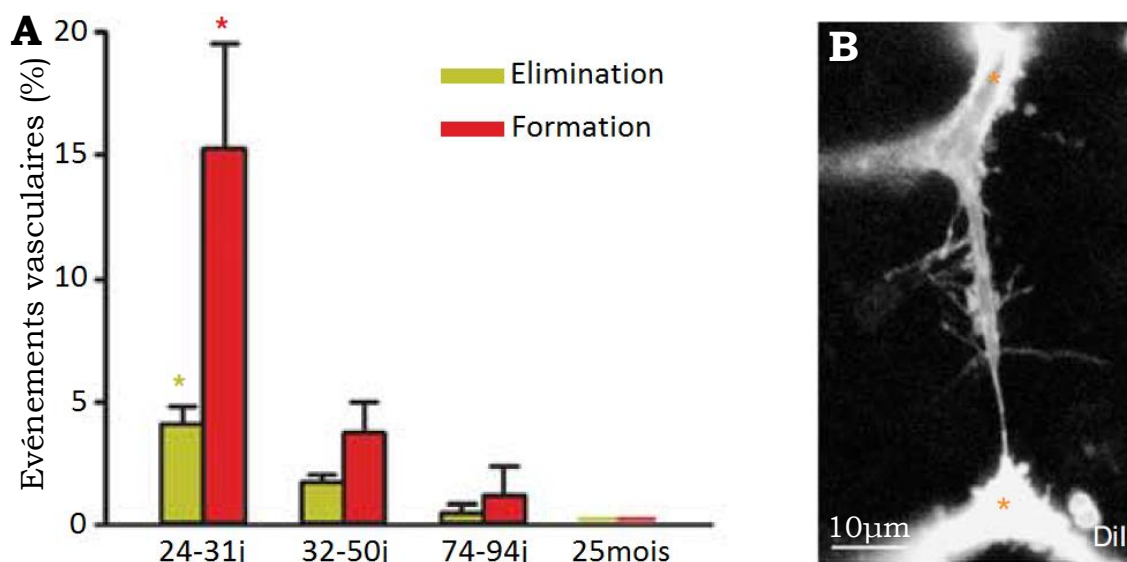


Figure 11 : Plasticité vasculaire chez la souris. **(A)** Quantification des formations et éliminations d'embranchements sur des images prises à un mois d'intervalle, à différents stades de la vie des souris. **(B)** « Tip cell » joignant deux capillaires par ses prolongements cellulaires, sans prolifération cellulaire (les noyaux sont indiqués par des astérisques oranges). D'après Harb et al., 2013.

Avant ces travaux, Ambrose (2012) avait émis l'hypothèse que la neuroangiogenèse était un phénomène essentiel tout du long de la vie adulte, afin de maintenir une microvasculature adaptée, en particulier dans le cortex cérébral. Pour lui, les déclin cognitifs (dont le déclin mnésique) observés chez de nombreuses personnes âgées ont un dénominateur commun : une baisse du taux d'angiogenèse chez l'adulte vieillissant. L'étude de Harb et al. apporte du poids à son point de vue, pour autant l'implication fonctionnelle de ce phénomène de plasticité vasculaire dans les processus cognitifs, en particulier dans les processus mnésiques, reste à préciser. *Concernant le processus de consolidation mnésique qui nous intéresse ici, rien n'a encore été fait sur le rôle joué par les vaisseaux sanguins cérébraux.* Les quelques travaux présentés ici laissent cependant imaginer que le processus de consolidation mnésique pourrait tout à fait s'accompagner de changements vasculaires aussi bien dynamiques que structurels, dont l'implication fonctionnelle serait alors à déterminer.

Des parties plus « techniques » concernant le réseau vasculaire, sur les mécanismes de l'angiogenèse, sur les différents moyens existants pour moduler ce phénomène, ainsi que sur la signalisation calcique au sein des artères cérébrales seront exposées plus en détail dans les courtes introductions des différents chapitres de résultats de ce manuscrit. La partie suivante offre une vue d'ensemble sur les objectifs de cette thèse.

III. Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons souligné, l'implication fonctionnelle des vaisseaux sanguins cérébraux dans le processus de consolidation mnésique (voir parties I.1, I.2 et I.3) est encore inconnue. Pour effectuer une approche nécessairement exploratoire, nous avons choisi d'utiliser un test comportemental adapté à l'étude de la consolidation mnésique et dans lequel certaines régions cérébrales impliquées à différents stades du processus ont été clairement identifiées. Nous avons ainsi choisi la tâche de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA) chez le rat (voir partie I.4), et défini 3 régions cérébrales d'intérêt ainsi que 2 artères cérébrales d'intérêt irriguant ces mêmes régions :

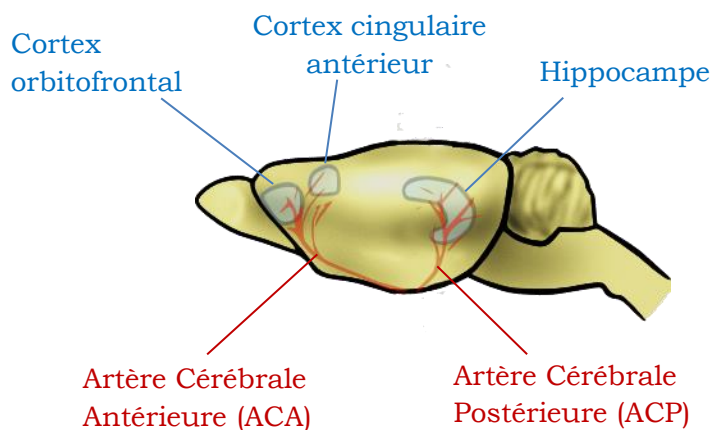


Figure 12 : Le cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire antérieur et l'hippocampe constituent nos régions cérébrales d'intérêt. Les artères cérébrales antérieures irriguent les régions corticales frontales dont nos deux régions corticales d'intérêt, alors que les artères cérébrales postérieures irriguent essentiellement l'hippocampe (voir partie II.1).

Dans ce test comportemental, durant l'encodage de l'information olfactive associative au cours de l'interaction sociale (voir partie I.4), nos 3 régions d'intérêt sont activées. Un jour après l'interaction (J1), le rappel de la mémoire récente dépend de l'hippocampe, mais est indépendant des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur (bien que leurs réseaux neuronaux impliqués dans l'encodage de cette mémoire soient déjà étiquetés, voir partie I.3). Suite au dialogue hippocampo-cortical et à une maturation des réseaux neuronaux corticaux, l'hippocampe se désengage au profit d'une prise en charge de la mémoire ancienne par le cortex (voir partie I.3). Ainsi, 30 jours après l'interaction (J30), il s'agit d'une mémoire ancienne consolidée dont le rappel est dépendant des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur, mais indépendant de l'hippocampe qui a été désengagé (voir partie I.4). Ces différentes étapes sont synthétisées sur la figure 13 en page suivante. D'autres régions cérébrales sont bien sûr susceptibles de jouer un rôle dans l'encodage et la rétention de cette mémoire, en particulier des régions corticales primaires permettant l'encodage de l'odeur, cependant notre étude s'est limitée à ces

trois régions d'intérêt dont l'implication au cours de ce processus est bien définie. De plus, ces régions sont des nœuds critiques du réseau neuronal sous-tendant la trace mnésique induite par le test de TSPA : en effet, une inactivation de l'hippocampe dorsal à J1, du cortex orbitofrontal à J30 ou du cortex cingulaire antérieur à J30 altère drastiquement le rappel de l'information à ces délais respectifs, les performances des rats avoisinant alors le niveau de hasard (Lesburguères et al., 2011).

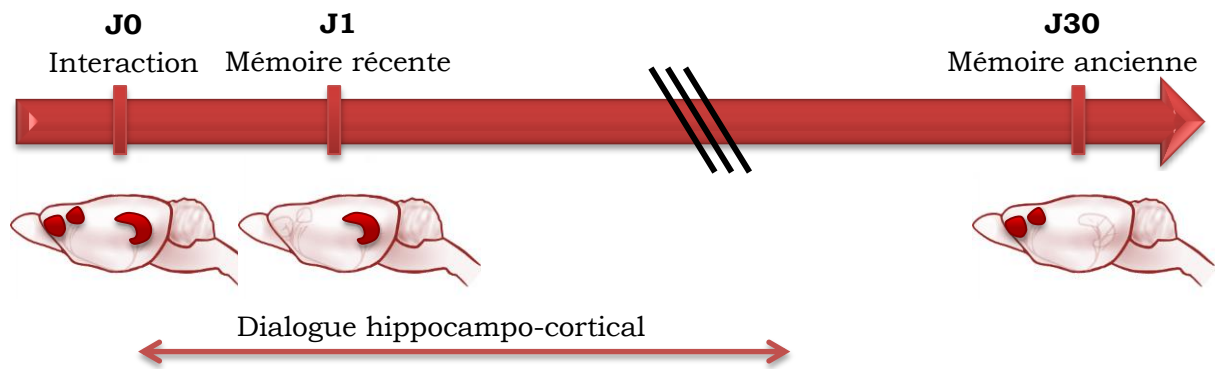


Figure 13 : Timing du processus de consolidation mnésique dans le test de TSPA.

Quelles sont les adaptations vasculaires susceptibles de se produire en réponse à l'activité neuronale induite par l'encodage, les réactivations hippocampo-corticales et le rappel de la mémoire induite par la tâche de TSPA (figure 14)?

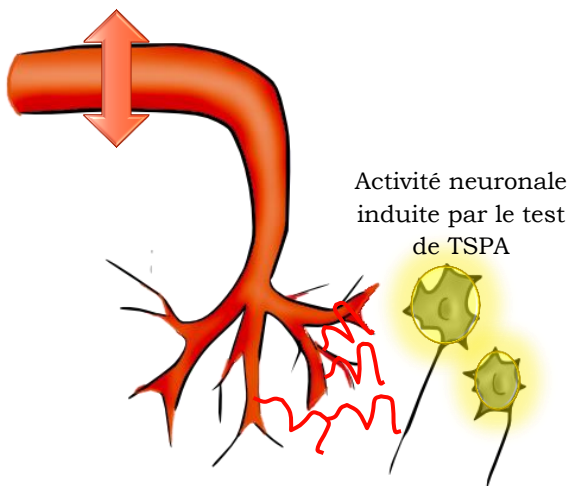


Figure 14 : En regard des parties II.1 et II.2, on peut envisager des changements dans la *réactivité* du réseau vasculaire, avec une modification de la capacité de contraction des artères cérébrales irriguant nos régions d'intérêt (flèche rouge). En regard de la partie II.3, on peut aussi envisager des changements dans la *structure* du réseau vasculaire via une angiogenèse locale (petits vaisseaux rouges).

Cela correspond aux deux premiers chapitres de résultats de cette thèse, qui sont purement *corrélatifs*, et visent à déterminer si de tels changements vasculaires accompagnent le processus de consolidation mnésique.

Le chapitre « **approche corrélative : réactivité vasculaire** » teste l'hypothèse que la consolidation mnésique s'accompagne de modifications de signalisation calcique des artères cérébrales irriguant nos régions d'intérêt, les ACA et les ACP (voir figure 12). Cette signalisation calcique contrôle leur capacité de contraction en réponse à un stimulus. Nous avons testé par imagerie calcique *ex vivo* la réponse des ACA et des ACP

à deux médiateurs provoquant la contraction des cellules musculaires lisses entourant la paroi des vaisseaux. Contrairement aux artérioles intracérébrales et aux capillaires sanguins, les artères piales peuvent être facilement prélevées et identifiées ; de plus elles participent aussi à la gestion du flux sanguin distribué en aval (voir partie II.2).

Le chapitre « **approche corrélative : architecture vasculaire** » teste l'hypothèse que la consolidation mnésique s'accompagne d'une modification de la densité du réseau vasculaire par angiogenèse dans nos régions d'intérêt. A l'aide de marquages permettant de visualiser les vaisseaux sanguins, nous avons calculé la densité de vaisseaux sanguins et la densité d'embranchements vasculaires dans chacune de nos régions d'intérêt. Des marquages de cellules endothéliales proliférantes ont de plus été réalisés.

Dans ces deux premiers chapitres, le résultat corrélatif qui a le plus éveillé notre curiosité est l'induction d'une angiogenèse précoce, même dans nos régions corticales d'intérêt qui ne prennent en charge le souvenir que plusieurs semaines après l'interaction. Nous avons cherché à moduler de façon *invasive* ce phénomène afin de déterminer son implication fonctionnelle dans le processus de consolidation mnésique.

Le chapitre « **approche invasive : modulation de l'angiogenèse** » teste l'hypothèse que bloquer (ou stimuler) l'angiogenèse corticale précoce détériore (ou améliore) les performances des rats lors du test de mémoire ancienne à J30. Les outils utilisés pour cibler spécifiquement le compartiment vasculaire sans impacter sur le compartiment neuronal sont détaillés dans ce chapitre. Nous montrons une amélioration des performances de mémoire ancienne des rats après stimulation de l'angiogenèse corticale précoce, ce qui suggère que le réseau vasculaire de base n'est pas optimal pour le processus de consolidation mnésique. Qu'en est-il alors pour d'autres tâches mnésiques ?

Le chapitre « **un principe généralisable ?** » teste l'hypothèse qu'augmenter la densité vasculaire hippocampique améliore les performances mnésiques de rats participant à des tâches hippocampo-dépendantes telles que le test de reconnaissance de nouvelle position d'objet ou le labyrinthe radiaire, une épreuve mnésique plus difficile et exigeante. Le protocole utilisé pour augmenter la densité vasculaire par injection intracérébrale de VEGF est détaillé dans ce chapitre. Ici, il n'est pas question de consolidation mnésique systémique, mais uniquement d'apprentissage (quasi-ponctuel pour le premier test, et se faisant sur plusieurs jours pour le second) et de rappel récent.

Ce manuscrit de thèse sera clôturé par une discussion générale et une conclusion, avant la partie « Matériels et méthodes » détaillant les protocoles utilisés.

Etude corrélative : réactivité vasculaire

Changements de signalisation calcique au
sein des artères piales cérébrales au cours de
la consolidation mnésique

I. Introduction sur la signalisation calcique vasculaire

1) Implication de la signalisation calcique vasculaire dans la régulation de la dynamique des vaisseaux sanguins cérébraux

Nous avons mentionné dans la partie II.2 de l'introduction générale la capacité des vagues calciques astrocytaires à provoquer une dilatation ou une contraction des vaisseaux que leurs pieds entourent (Zonta et al., 2003). Les travaux de Filosa et al. (2004) montrent de plus un lien entre les variations de calcium intracellulaire des astrocytes et celles des cellules musculaires lisses adjacentes. En effet, au sein de coupes corticales, l'augmentation de l'activité neuronale déclenchée par stimulation électrique provoque des vagues calciques astrocytaires associées à une suppression des oscillations spontanées de calcium dans les cellules musculaires lisses (figure 15A) et du diamètre (figure 15B) des artérioles. S'il est difficile d'extrapoler cette expérience réalisée sur tranches à ce qu'il se passe *in vivo*, cette étude suggère que les vagues calciques astrocytaires peuvent servir d'intermédiaire entre l'activité neuronale et la réponse vasculaire, et indique que cela pourrait passer par un effet sur les variations de calcium au sein des cellules musculaires lisses entourant les artérioles.

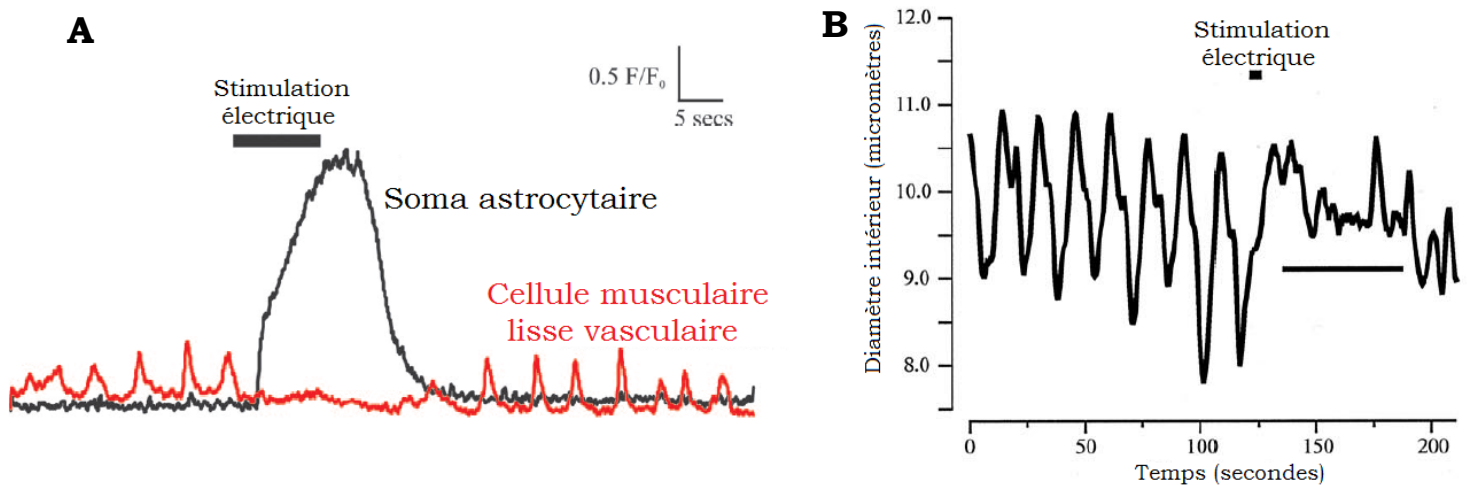


Figure 15 : Effet d'une stimulation électrique **(A)** sur les variations de calcium intracellulaire au sein d'un astrocyte et d'une cellule musculaire lisse adjacente et **(B)** sur les oscillations spontanées du diamètre des artérioles (vasomotion). D'après Filosa et al., 2004.

L'importance des variations de calcium cytoplasmique des cellules musculaires lisses vasculaires dans leur contraction est connue depuis longtemps. Somlyo and Somlyo (1994) ont ainsi mis en évidence que l'augmentation globale de calcium cytoplasmique est un événement clé dans l'activation des protéines contractiles de la cellule musculaire lisse, et donc dans la contraction du vaisseau qu'elle entoure. Cette

contraction peut ensuite se maintenir par des phosphorylations sensibilisant les protéines contractiles des muscles lisses à des concentrations de calcium plus faibles (Savineau and Marthan, 1997). Au contraire, des événements calciques locaux (appelés « sparks » ou étincelles calciques), via une activation des canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance provoquant une hyperpolarisation du potentiel de membrane, conduisent à une vasodilatation (Nelson et al., 1995). D'autres types de signaux calciques (oscillations calciques, invasion calcique cytoplasmique) activent d'autres processus cellulaires tels que la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Barlow et al., 2006).

Ainsi, l'étude de la signalisation calcique au sein des cellules musculaires lisses des artérioles cérébrales irriguant des territoires neuronaux d'intérêt peut permettre de révéler d'éventuelles modifications de la capacité du réseau vasculaire cérébral à se contracter ou se relaxer au cours de la consolidation mnésique.

2) Mécanismes de la signalisation calcique vasculaire

Le réticulum sarcoplasmique (RS), stock de calcium au sein des cellules musculaires lisses vasculaires, est impliqué dans l'homéostasie calcique cellulaire via la libération ou la recapture de calcium dans le cytoplasme (pour revue voir Wray and Burdya, 2010). Les SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase) sont les principaux transporteurs du calcium du cytoplasme vers le RS (figure 16). Au sein de ce dernier, la présence de protéines se liant au calcium (la calréticuline et la calséquestrine) permet de le piéger à l'intérieur du RS, et ainsi de constituer des stocks de calcium significatifs. Ainsi, l'ouverture de canaux calciques à la membrane du RS peut libérer du calcium vers le cytosol. Pour l'heure, deux familles de canaux de ce type ont été identifiées : les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃R) et les récepteurs à la ryanodine (RyR) (pour revues, voir Morel et al., 2007 et Dabertrand et al., 2013).

Les InsP₃R sont activés par l'inositol 1,4,5-triphosphate, lui-même produit par l'activation de la phospholipase C en réponse à l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Les InsP₃R sont donc impliqués dans la réponse à différentes molécules vasoactives telles que l'endothéline 1, l'acétylcholine, la noradrénaline ou encore la sérotonine. La libération de calcium par les InsP₃R est de plus modulée par la concentration en calcium cytosolique, cette modulation différant selon les sous-types d'InsP₃R (3 différents sous-types et des variants d'épissage ont été actuellement identifiés), et ces propriétés seraient fondamentales dans la génération d'oscillations calciques en réponse à des vasoconstricteurs (Berridge, 2008). Nous ne nous étendrons

pas plus sur cette famille de canaux calciques, qui ne vont pas nous concerner dans les protocoles expérimentaux que nous avons mis en place. Les RyR, au contraire, vont y être impliqués.

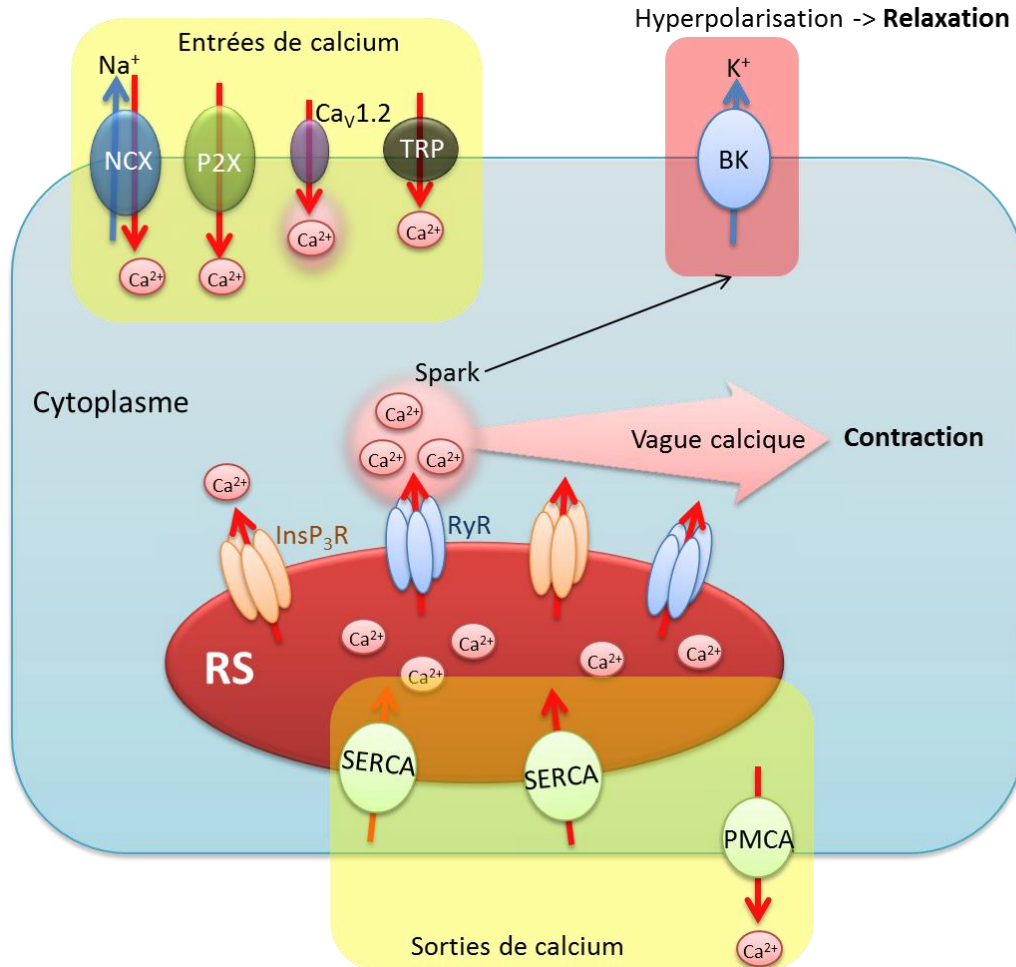


Figure 16 : Différents acteurs de la signalisation calcique dans une cellule musculaire lisse vasculaire. A la membrane, les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), les récepteurs P2X, les canaux $\text{Ca}_v1.2$ de type L et les canaux TRP permettent l'entrée de calcium dans le cytosol. Les PMCA pompent le calcium cytosolique pour l'extruder hors de la cellule. Voir le texte pour les autres détails. D'après Berridge, 2008.

Il existe 3 différents sous-types de RyR, RyR1, RyR2 et RyR3 et des variants d'épissage. Les canaux calciques fonctionnels sont formés de 4 sous-unités, de la même façon que pour les InsP_3R . Les 3 sous-types sont exprimés dans la microcirculation cérébrale aussi bien que dans les artères piales de surface. Les RyR peuvent être activés par la charge calcique au sein du réticulum sarcoplasmique, ainsi que par la liaison de calcium cytosolique aux canaux. Ainsi, les RyR peuvent être activés par l'entrée de calcium par les différents canaux à la membrane de la cellule (figure 16) ou par le calcium libéré du réticulum sarcoplasmique par des InsP_3R ou des RyR adjacents. Ce mécanisme porte le nom de CICR (Calcium-Induced Calcium Release, libération de calcium induite par le calcium).

Deux types d'événements calciques reposent sur les RyR : les sparks (étincelles) et les vagues calciques. Un spark correspond à une augmentation locale de calcium qui, comme signalé plus haut, conduit à la relaxation de la cellule via l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance (BK, voir figure 16). Si la probabilité d'ouverture des RyR adjacents ($RyR P_o$) est faible, cet événement restera local. Si au contraire $RyR P_o$ est assez élevée, cette augmentation locale de calcium conduira via le mécanisme de CICR à l'activation des RyR adjacents (les $InsP_3R$ étant aussi susceptibles de contribuer à la propagation des vagues calciques), initiant ainsi une vague calcique à travers tout le cytoplasme (figures 16 et 18), conduisant à la contraction de la cellule par le biais de l'activation de ses protéines contractiles (figure 17). Suite à ces événements calciques, les SERCA, les PMCA et les échangeurs Na^+/Ca^{2+} sont mis à contribution pour rétablir la concentration calcique initiale au sein du cytosol.

L'appareil contractile des cellules musculaires lisses est formé de filaments d'actine et de myosine (figure 17). Libéré en grandes quantités dans le cytosol, le calcium va pouvoir se complexifier avec différentes molécules dont la calmoduline (CaM), lui permettant alors d'interagir avec la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). Cette enzyme va phosphoryler les chaînes légères de la myosine, la rendant capable d'interagir avec les filaments d'actine, provoquant ainsi le glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais. Cela aboutit à la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (Cole and Welsh, 2011, voir figure 17).

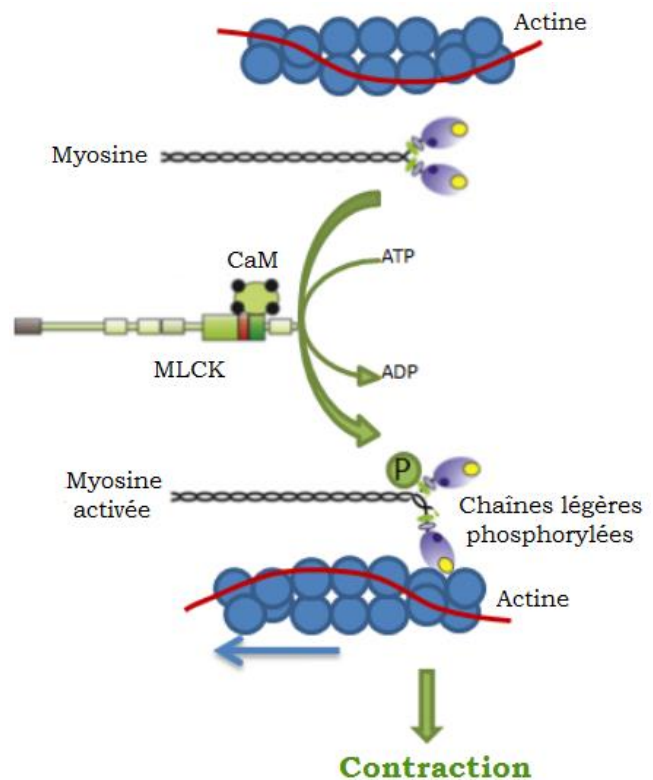


Figure 17 : Activation de l'appareil contractile par le complexe calcium-calmoduline. D'après Cole and Welsh, 2011.

Il a été mis en évidence que $RyR P_o$ dépend du pH environnant et du type de vaisseau : artères piales à la surface du cerveau ou artérioles qui y pénètrent (figure 18, pour revue voir Dabertrand et al., 2013). A pH physiologique (7,3 au sein du fluide cérébrospinal), on observe essentiellement des sparks au sein des artères piales et des vagues calciques au sein des artérioles intracérébrales, déclenchés de façon spontanée.

Cela contribue certainement au plus important tonus myogénique de ces dernières, en comparaison avec les artères piales au sein desquelles les sparks calciques peuvent contrebalancer la contraction induite par la pression sanguine. La figure 18 suggère qu'en acidifiant le milieu externe (par exemple dans des conditions pathologiques), les artérioles intracérébrales se dilatent, en raison d'une prédominance des sparks sur les vagues calciques.

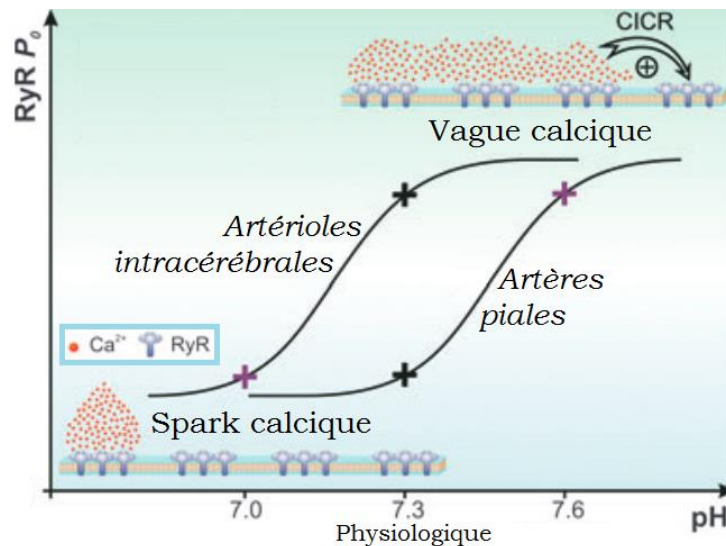


Figure 18 : Sparks ou vagues calciques au sein des cellules musculaires lisses entourant les artérioles intracérébrales et les artères piales. D'après Dabertrand et al., 2013.

Ces données mettent en évidence des *différences fonctionnelles entre les artères piales et les artérioles intracérébrales, qui sont directement en contact avec les pieds astrocytaires et les terminaisons des interneurons*. Mais comme expliqué dans la partie II.2 de l'introduction générale, *ces artères piales contribuent à la gestion du flux sanguin distribué dans la zone d'activité neuronale*.

Dans l'expérience qui suit, nous allons nous intéresser à la réponse *ex vivo* des artères piales à des vasoconstricteurs (caféine et chlorure de potassium) provoquant des vagues calciques.

II. Réponse *ex vivo* des artères cérébrales à des médiateurs provoquant leur contraction

1) Protocole expérimental

L'objectif de cette expérience est de tester l'hypothèse que les artères cérébrales antérieures (ACA) et postérieures (ACP) irriguant nos régions cérébrales d'intérêt (régions corticales et hippocampiques, respectivement) voient leur signalisation calcique modifiée au cours de la consolidation mnésique. Nous avons deux groupes de rats :

- les rats expérimentaux (**exp**) interagissent avec un démonstrateur ayant mangé du cumin, et encodent ainsi une nouvelle mémoire olfactive associative ;
- les rats témoins (**ctrl**) interagissent avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle non aromatisée (appelée « plain »), et n'encodent donc pas de nouvelle mémoire de ce type.

Ces rats sont testés soit 1 jour après l'interaction (**J1**), un délai auquel l'hippocampe (irrigué par les ACP) est impliqué dans le rappel de la mémoire récente, soit 30 jours après (**J30**), un délai auquel les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur (irrigués par les ACA) sont impliqués dans le rappel de la mémoire ancienne.

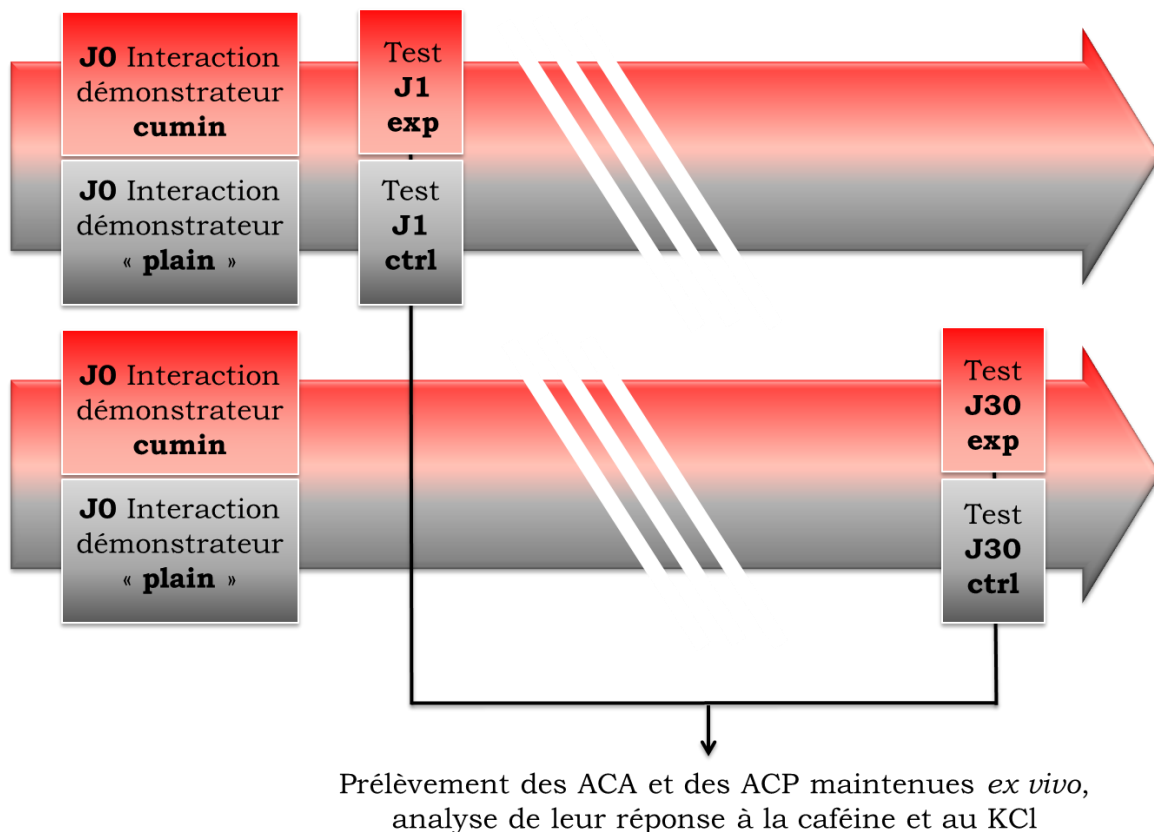


Figure 19 : Design expérimental.

Immédiatement après le test de préférence alimentaire, les rats de ces 4 groupes ont été guillotisés alertes afin de ne pas perturber l'état de leurs vaisseaux sanguins avec un anesthésique. Nous avons prélevé les ACA et les ACP (artères piales à la surface du cerveau) avec leurs ramifications de premier ordre, elles ont ensuite été maintenues *ex vivo* (voir la partie « Matériels et méthodes » pour plus de détails) et nous avons analysé l'augmentation de calcium cytosolique au sein des cellules musculaires lisses entourant ces artérioles de surface en réponse à la caféine et au chlorure de potassium (KCl). La caféine active les RyR, entraînant une libération de calcium du RS, tandis que l'application d'un milieu riche en KCl provoque une dépolarisation membranaire produisant une entrée de calcium via les canaux voltage-dépendants, entraînant elle-même l'activation des RyR et une libération de calcium du RS. Dans les deux cas, la vague calcique induite par ces médiateurs conduit à la contraction des cellules musculaires lisses (Morel et al., 2007).

Les médiateurs utilisés présentent l'avantage d'être spécifiques d'un type de canal calcique ; cela permet de révéler d'éventuelles modifications de la signalisation calcique au sein des artères piales et leur capacité ex vivo à se contracter.

2) Résultats comportementaux

Les quelques rats n'ayant pas obtenu de bonnes performances comportementales ont été écartés, l'analyse a été réalisée sur les 7 rats les plus représentatifs de chaque condition. Il s'agissait en effet de ne pas parasiter l'étude avec des rats expérimentaux qui n'auraient pas bien encodé l'information transmise lors de l'interaction sociale.

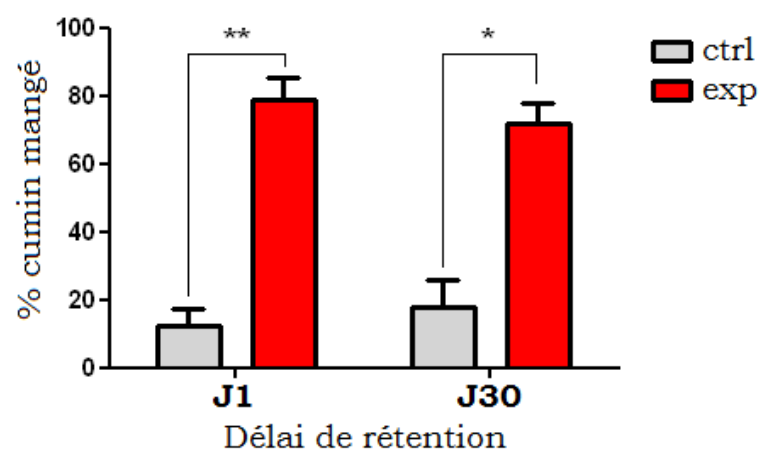


Figure 20 : Résultats de la tâche de TSPA. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention (choix entre de la nourriture aromatisée au thym ou au cumin) à 1 jour ou 30 jours par les rats témoins (ctrl) et expérimentaux (exp) analysés ensuite en imagerie calcique. * $p < 0,05$ exp versus ctrl, ** $p < 0,01$ exp versus ctrl, test post-hoc de Dunn. $n=7$ rats par groupe.

La figure 20 présente les performances à la tâche de TSPA des rats utilisés. Les rats des groupes contrôles ayant interagi avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture non aromatisée ont montré une préférence innée pour le thym, similaire pour les deux délais de rétention (test post-hoc de Dunn, J1ctrl versus J30ctrl $p > 0,05$; NS). Un test de Kruskal-Wallis permet de conclure que les performances diffèrent suivant les groupes ($p = 0,0002$). La préférence alimentaire a été inversée suite à l'interaction avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture aromatisée au cumin, si bien que les rats des groupes expérimentaux ont consommé cette dernière de façon majoritaire, quel que soit le délai de rétention considéré (test post-hoc de Dunn, J1ctrl versus J1exp $p < 0,01$ / J30ctrl versus J30exp $p < 0,05$). De plus, l'information acquise dans cette tâche est durable et insensible à l'oubli sur la durée de notre étude (test post-hoc de Dunn, J1exp versus J30exp $p > 0,05$; NS).

Nous avons aussi contrôlé la quantité totale de nourriture consommée au cours du test de préférence alimentaire.

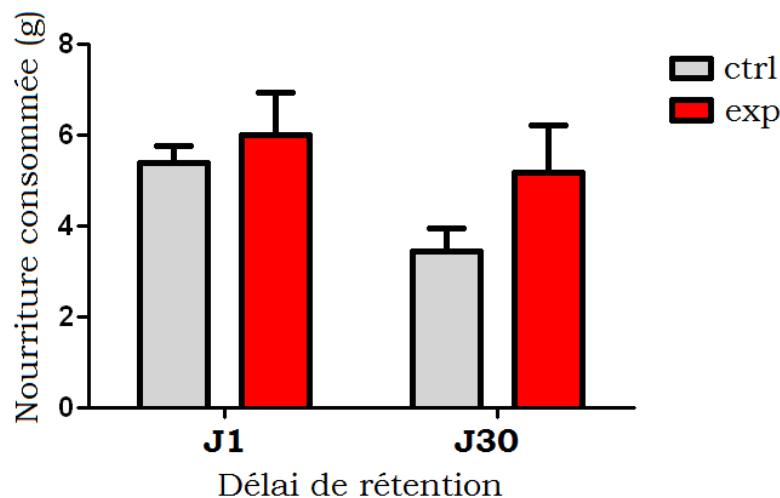


Figure 21 : Quantité totale de nourriture consommée (cumin + thym) au cours du test de préférence par les rats analysés ensuite en imagerie calcique. $n = 7$ rats par groupe.

Aucune différence significative dans la quantité totale de nourriture consommée lors des séances de rétention n'a été observée entre les groupes ctrl et exp (ANOVA à deux facteurs, effet groupe $F(1,24) = 2,42$; $p = 0,13$; NS). Les différences de performances observées entre les groupes ne sont donc pas la conséquence de disparités dans le niveau de motivation des animaux lors du test de préférence alimentaire.

3) Réponse des ACP à la caféine et au KCl

La réponse des ACP aux deux médiateurs provoquant l'entrée de calcium au sein de leurs cellules musculaires lisses est représentée sur la figure 22.

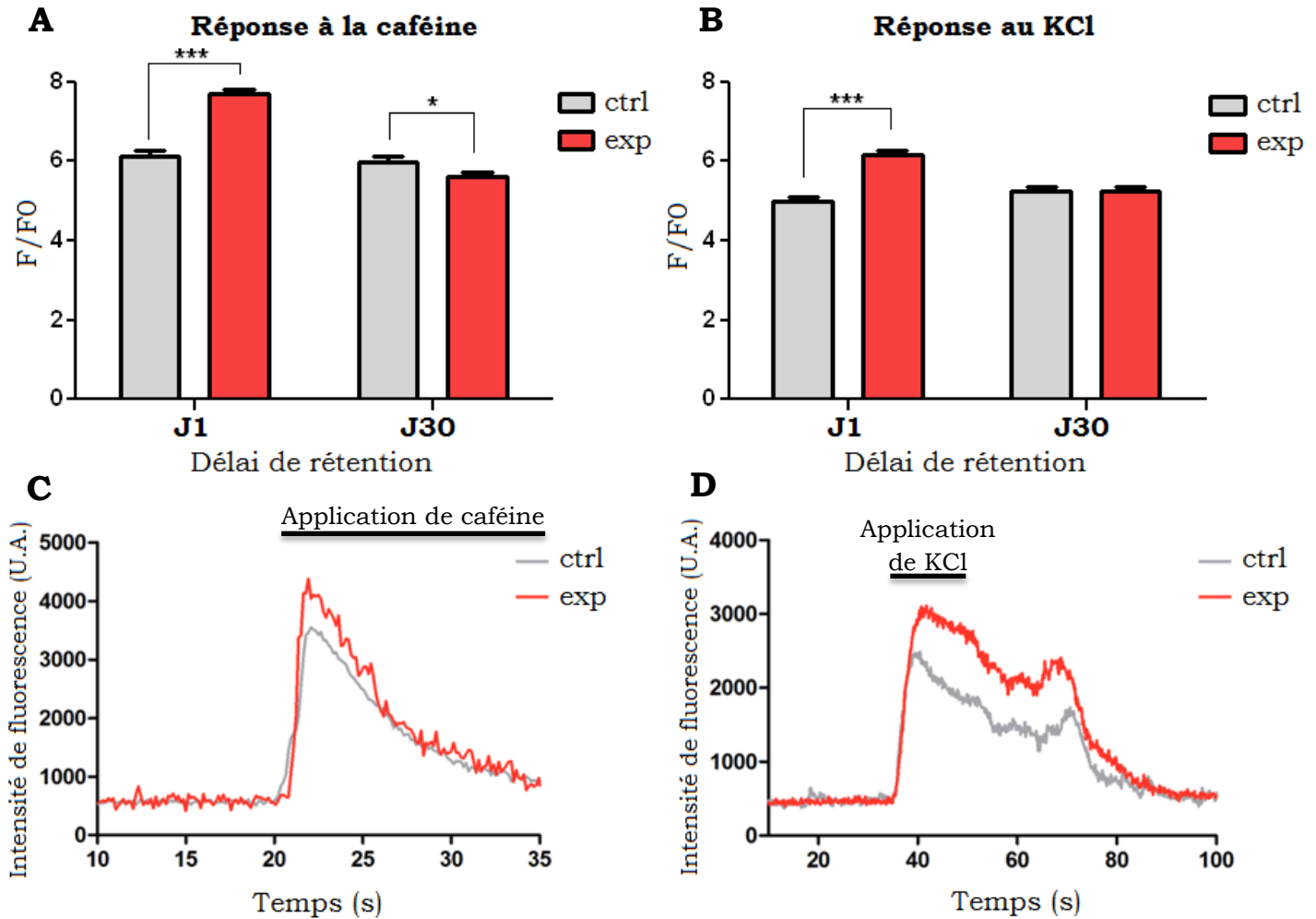


Figure 22 : Réponse des cellules musculaires lisses des ACP de diamètre inférieur à 35 microns provenant de rats témoins et expérimentaux, en fonction de l'intervalle de rétention. L'augmentation de fluorescence $F_{\text{maximale}}/F_{\text{repos}}$ provoquée par **(A)** la caféine ou **(B)** le KCl a été mesurée. $n=258-387$ cellules par groupe (provenant de 7 rats).
 *** $p<0,001$ exp versus ctrl, * $p<0,05$ exp versus ctrl, test post-hoc de Bonferroni.
(C, D) : traces représentatives des réponses calciques **(C)** à la caféine et **(D)** au KCl chez des rats testés à J1.

Un jour après l'interaction sociale, nous avons observé une augmentation de la réponse calcique maximale à la caféine et au KCl chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins (ANOVA, caféine +25,3%, effet groupe ctrl versus exp $F(1,1141)=21,75$; $p<0,0001$; test post-hoc de Bonferroni $p<0,001$ à J1 / KCl +23,3%, effet groupe ctrl versus exp $F(1,1269)=23,47$; $p<0,0001$; test post-hoc de Bonferroni $p<0,001$ à J1). Les réponses calciques sont illustrées sur les figures 22C et 22D. Cet effet est transitoire (caféine interaction groupe x délai $F(1,1141)=62,53$; $p<0,0001$ / KCl interaction groupe x délai $F(1,1269)=23,00$; $p<0,0001$), et disparaît 30 jours après l'interaction sociale. On observe de plus une légère diminution de la réponse calcique à J30 chez les rats

expérimentaux, révélée par application de caféine (test post-hoc de Bonferroni $p < 0,05$) mais pas de KCl.

4) Réponse des ACA à la caféine et au KCl

La réponse des ACA aux deux médiateurs provoquant l'entrée de calcium au sein de leurs cellules musculaires lisses est représentée sur la figure 23.

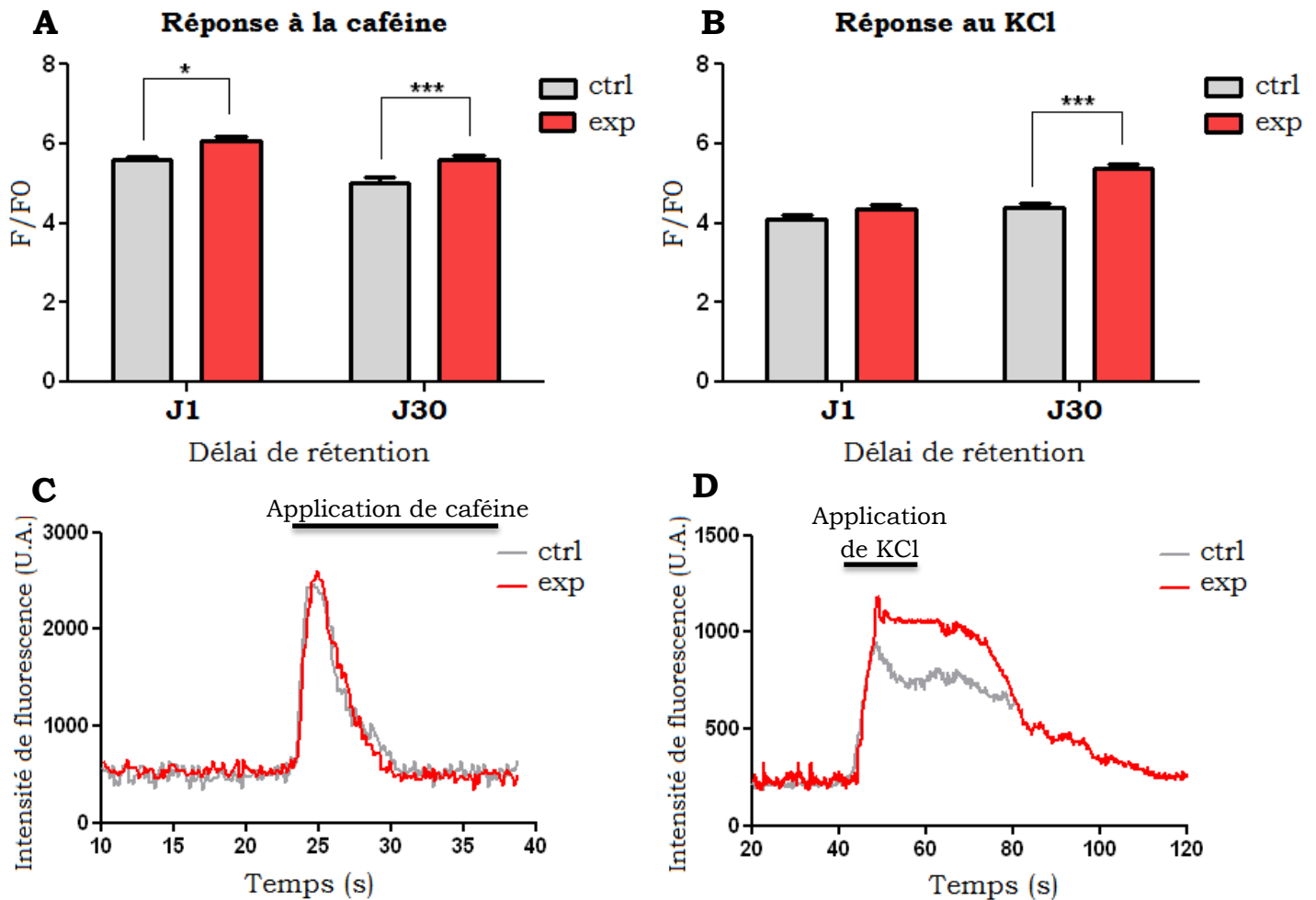


Figure 23 : Réponse des cellules musculaires lisses des ACA de diamètre inférieur à 35 microns provenant de rats témoins et expérimentaux, en fonction de l'intervalle de rétention. L'augmentation de fluorescence $F_{\text{maximale}}/F_{\text{repos}}$ provoquée par **(A)** la caféine ou **(B)** le KCl a été mesurée. $n=180-353$ cellules par groupe (provenant de 7 rats).

*** $p < 0,001$ exp versus ctrl, * $p < 0,05$ exp versus ctrl, test post-hoc de Bonferroni.

(C, D) : traces représentatives des réponses calciques **(C)** à la caféine et **(D)** au KCl chez des rats testés à J30.

30 jours après l'interaction sociale, nous avons observé une augmentation de la réponse calcique maximale à la caféine et au KCl chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins (ANOVA, caféine +11,6%, effet groupe ctrl versus exp $F(1,1101)=20,25$; $p < 0,0001$; test post-hoc de Bonferroni $p < 0,001$ à J30 / KCl +22,1%, effet groupe ctrl

versus exp $F(1,988)=31,29$; $p<0,0001$; test post-hoc de Bonferroni $p<0,001$ à J30). Cet effet est illustré sur les figures 23C et 23D. Concernant la réponse au KCl, celle-ci varie avec le délai (interaction groupe x délai $F(1,988)=11,16$; $p=0,0009$), une augmentation n'étant détectée qu'à J30. On observe de plus une légère augmentation de la réponse calcique dès J1 chez les rats expérimentaux, révélée par application de caféine (test post-hoc de Bonferroni $p<0,05$) mais pas de KCl.

5) Conclusion

L'induction d'une nouvelle mémoire olfactive associative lors de l'interaction sociale de la tâche de TSPA provoque des modifications de signalisation calcique au sein des artérioles à la surface du cerveau. Celles-ci sont dépendantes à la fois du délai de rétention (J1 ou J30) et des artères cérébrales dont elles sont issues (ACA ou ACP). Les modifications les plus nettes concernent les ACP à J1, délai auquel l'hippocampe qu'elles irriguent est impliqué dans le rappel de la mémoire récente, et les ACA à J30, délai auquel le cortex cingulaire antérieur et le cortex orbitofrontal qu'elles irriguent sont impliqués dans le rappel de la mémoire ancienne. Ces résultats sont donc en accord avec l'implication initiale puis le désengagement de l'hippocampe en fin de consolidation mnésique, ainsi qu'avec la prise en charge de la mémoire ancienne par le cortex.

La légère diminution de la réponse calcique de l'ACP chez les rats expérimentaux à J30 après application de caféine peut être mise en parallèle à la baisse des niveaux d'expression de la protéine Fos dans l'hippocampe chez les rats expérimentaux par rapport aux contrôles lors du rappel réalisé à ce même délai de 30 jours (thèse d'Edith Lesburguères), traduisant une inhibition de cette structure lors du rappel de mémoire ancienne.

La légère augmentation de la réponse calcique de l'ACA chez les rats expérimentaux dès J1 après application de caféine peut traduire des modifications vasculaires précoces commençant à se mettre en place pour ces artères irriguant des régions corticales dont les réseaux neuronaux ont déjà été étiquetés, et ont déjà amorcé un dialogue avec l'hippocampe. Elles pourraient aussi refléter une implication du cortex piriforme, irrigué en partie par les ACA, dans le rappel de la mémoire récente aussi bien qu'ancienne.

Pris ensemble, nos résultats suggèrent que la dynamique du réseau vasculaire cérébral s'adapte à l'utilisation du souvenir par des modifications de la signalisation calcique qui persistent lorsque les vaisseaux sont étudiés *ex vivo*.

III. Discussion

L'encodage, la consolidation et le rappel d'une mémoire olfactive associative provoquent des modifications de signalisation calcique au sein des artères piales, traduisant des changements dans la réactivité du réseau vasculaire au cours du processus de consolidation mnésique. Ces modifications dépendent du délai (J1 ou J30) ainsi que des régions irriguées (par les ACA ou les ACP) et sont en accord avec l'implication initiale de l'hippocampe, son désengagement et la prise en charge corticale en fin de processus de consolidation mnésique, montrant que la dynamique du réseau vasculaire cérébral s'adapte à l'utilisation du souvenir en réponse à l'activation neuronale. Les modifications cellulaires et moléculaires mises en place lors de ces adaptations sont maintenues lors du prélèvement et de l'analyse *ex vivo* de la réactivité de ces vaisseaux

Contraction ou dilatation augmentée : répondre à la demande métabolique accrue

L'interprétation des résultats d'imagerie calcique *ex vivo* nécessite de tenir compte de différents paramètres : 1) les vaisseaux sanguins sont étudiés dans un environnement très différent de l'environnement *in vivo* dans lesquels ils se trouvaient, 2) ils sont non pressurisés, 3) ils sont stimulés avec des molécules vasoactives non physiologiques. On est donc loin de ce qu'il serait l'idéal d'observer : une réponse *in vivo* de ces vaisseaux à l'activité neuronale provoquée lors du rappel mnésique.

Cependant, les modifications de signalisation calcique détectées se traduisant par une capacité de contraction accrue en réponse à un stimulus *ex vivo*, elles pourraient refléter une capacité de contraction *in vivo* qui était accrue. De fait, si une artériole de surface se contracte plus, elle va pulser plus efficacement le sang vers les régions en aval, ce qui pourrait permettre de répondre à une demande métabolique accrue de l'hippocampe en début de processus de consolidation mnésique, et à une demande accrue des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur en fin de consolidation mnésique.

L'augmentation de réactivité que nous observons *ex vivo* pourrait au contraire refléter une vasodilatation *in vivo* par exemple par des modifications des RyR facilitant l'apparition de sparks calciques (voir introduction I.1 de ce chapitre). Ainsi les artères piales vasodilatées par l'activation neuronale pourraient répondre de façon plus ample aux stimuli vasoconstricteurs. Afin de pouvoir déterminer à quoi correspondent, *in vivo*, les modifications de réponse calcique observées *ex vivo*, une expérience reposant sur l'imagerie de vaisseaux sanguins *in vivo* est actuellement en cours (avec Jean-Luc Morel dans l'équipe), elle est décrite en fin de discussion.

Stockage et/ou rappel

Les artères cérébrales ayant été prélevées immédiatement après le test de préférence, on ne peut exclure une influence du rappel mnésique sur les modifications de signalisation calcique que nous détectons. Il est probable que celles-ci reflètent deux phénomènes distincts : d'une part la mise en place et les modifications du réseau neuronal sous-tendant la trace mnésique ; d'autre part le rappel mnésique. Pour statuer sur cette question, il suffirait de refaire la même expérience avec deux groupes de rats interagissant avec un démonstrateur ayant mangé du cumin, un groupe étant soumis au test de préférence et l'autre non avant l'euthanasie et l'imagerie calcique *ex vivo*.

D'autres régions impliquées ?

Une limite de notre expérience est que lorsque nous prélevons et nettoyons les ramifications des ACA et des ACP, il nous est impossible de déterminer précisément quel territoire neuronal irriguaient les vaisseaux que nous analysons. Les ACA en particulier irriguent d'autres régions que nos deux zones corticales d'intérêt. Cela lève une question : y a-t-il d'autres régions cérébrales que nos trois régions d'intérêt qui seraient aussi impliquées dans la tâche de TSPA, et leur activité est-elle susceptible d'avoir influencé nos résultats d'imagerie calcique ?

Le bulbe olfactif (irrigué par les ACA) et le cortex piriforme (irrigué par les ACA et les artères cérébrales moyennes) sont certainement impliqués dans l'encodage de l'odeur nouvelle chez les rats expérimentaux (Sanchez-Andrade et al., 2005). On peut soupçonner une implication dans le stockage et le rappel de la mémoire récente aussi bien qu'ancienne du cortex piriforme. Comme précisé dans la conclusion de l'expérience, la légère augmentation de réponse calcique maximale des ACA dès J1 chez les rats expérimentaux pourrait traduire cette implication à court terme. Le cortex préfrontal médian (irrigué par les ACA) est susceptible d'avoir joué un rôle similaire : les données de thèse d'Edith Lesburgères montrent en effet son implication dans le rappel de la mémoire récente à J1 (ainsi qu'à J30).

Mécanismes moléculaires

Nos résultats suggèrent que des modifications impliquant les RyR, les canaux ryanodine du réticulum sarcoplasmique, sont intervenues sur les ACP 1 jour après l'interaction sociale et sur les ACA 30 jours après, celles-ci entraînant une augmentation plus forte de calcium dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses en réponse à la caféine et au KCl. Une modification des canaux calciques voltage-dépendants ne peut être écartée et pourrait être vérifiée par une étude de la réponse au

KCl en présence de ryanodine. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'augmentation des réponses impliquant les canaux ryanodine : (1) une régulation transcriptionnelle conduisant à une augmentation d'expression des canaux ryanodine, (2) une modification d'adressage ou de régulation de leur activité (phosphorylation) ou (3) une augmentation du remplissage du stock de calcium du réticulum sarcoplasmique (par régulation ou surexpression des SERCA). Ces mécanismes n'ont pas été étudiés au cours de cette thèse car nous avons choisi d'étudier plus en détail une autre adaptation vasculaire (voir le chapitre suivant) intervenant lors de la consolidation mnésique.

Interprétation *in vivo* : perspectives et design expérimental

Nous disposons au laboratoire d'appareils de microscopie par fibre optique (Cell Vizio, Mauna Kea) permettant l'imagerie *in vivo* des vaisseaux sanguins à la surface ou au sein du cerveau de rongeurs après injection d'un traceur fluorescent dans le sang (Laemmel et al., 2004 ; Vincent et al., 2006). Nous avons imaginé l'expérience décrite ci-dessous afin de corrélater nos données d'imagerie calcique *ex vivo* à des réponses vasculaires *in vivo* (figure 24).

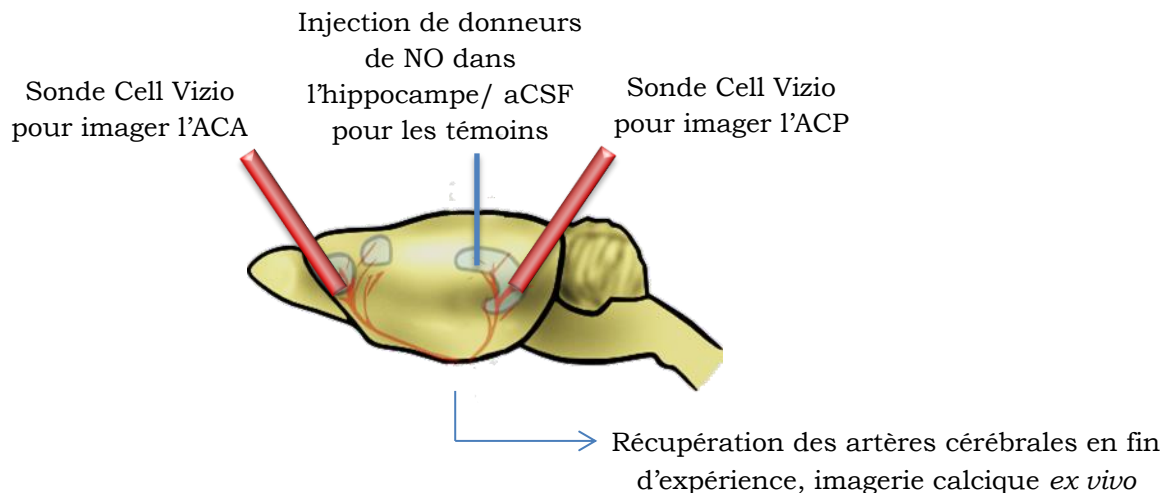


Figure 24 : Schéma de l'expérience complémentaire permettant d'étudier la réactivité *in vivo* et *ex vivo* des vaisseaux cérébraux irriguant une zone cible d'activité neuronale.

Il s'agit de mimer l'activité neuronale induite lors du processus de consolidation mnésique. La production d'oxyde nitrique (NO), puissant vasodilatateur, est une conséquence de l'activité neuronale. Les donneurs de NO permettent la libération de NO sur de longues périodes pouvant s'étendre jusqu'à plusieurs jours. Faisant l'hypothèse que les modifications de réactivité calcique *ex vivo* sont dues à une activité neuronale soutenue, répétée (phénomène de « replays » discuté en partie I.3 de l'introduction générale) ou à un effet aigu (par exemple dû au rappel mnésique, voir paragraphe ci-dessous), l'utilisation de donneurs de NO nous semble appropriée. Nous aurions ainsi deux groupes de rats : l'un qui reçoit des donneurs de NO, l'autre qui reçoit du fluide

cérébrospinal (aCSF) comme témoin, dans l'hippocampe ou le cortex orbitofrontal. Le jour suivant, les ACP et les ACA pourront être imagées, afin de déterminer leur réactivité basale en termes de débit sanguin et de variations de diamètre, ainsi que leur réponse à un stimulus (injection systémique de phényléphrine, application locale de caféine).

En fin d'expérience, les ACP et les ACA seront prélevées et leurs réponses *ex vivo* à la caféine et au KCl seront analysées. Si les résultats de cette expérience correspondent à nos attentes, elle permettra :

- de corréler les modifications de signalisation calcique que nous avons détectées en imagerie *ex vivo* avec des modifications de débit sanguin et de diamètre *in vivo* des artères piales correspondantes ;
- de corréler ces modifications de la dynamique vasculaire à l'activité neuronale, génératrice de NO.

Dans le chapitre suivant, nous allons nous intéresser à la structure du réseau vasculaire, avec l'avantage de pouvoir l'analyser localement dans nos trois régions d'intérêt dont on connaît l'implication aux différents stades de la consolidation mnésique.

Etude corrélative : architecture vasculaire

Changements de densité vasculaire et
prolifération cellulaire au cours de la
consolidation mnésique

I. Introduction sur les mécanismes de l'angiogenèse

Chez l'adulte, il est communément admis que l'angiogenèse n'a lieu hors pathologies que lors du cycle menstruel, ainsi qu'en cas de cicatrisation ou de régénération de tissu. Un peu comme le dogme « il n'y a pas de nouveaux neurones qui se forment dans un cerveau adulte sain » qui a longtemps perduré avant que la neurogenèse chez l'adulte soit largement admise, le dogme « il n'y a pas de nouveaux vaisseaux qui se forment dans un cerveau adulte sain » s'ébranle petit à petit. On connaît déjà l'existence de niches neuroangiogéniques cérébrales où neurogenèse et angiogenèse coopèrent, sans surprise puisque ces deux processus partagent des mécanismes moléculaires communs (Palmer et al., 2000 ; Yamashima et al., 2004 ; Madri, 2009). La partie II.3 de l'introduction générale montre de plus que l'angiogenèse cérébrale semble être un processus plus généralisé (voir aussi Morita et al., 2013) pouvant potentiellement être impliqué dans des processus mnésiques. Pour autant, des évidences claires manquent et l'existence et le rôle d'un tel phénomène au cours de la consolidation mnésique n'ont encore jamais été étudiés.

Dans ce chapitre, nous allons vérifier si des changements structurels du réseau vasculaire par un mécanisme d'angiogenèse se mettent en place durant la consolidation de la mémoire induite par la tâche de TSPA. Cette introduction expose les mécanismes de l'angiogenèse.

1) Différents modes d'angiogenèse

Plusieurs façons de former un nouveau vaisseau ont été identifiées (Carmeliet and Jain, 2011). Au sein de l'embryon de mammifère, les angioblastes se différencient en cellules endothéliales mobilisées pour former un réseau vasculaire, un processus portant le nom de vasculogenèse. S'ensuit alors une phase d'angiogenèse, permettant l'expansion de ce réseau vasculaire initial. Celle-ci peut se produire suivant différents modes : par « sprouting » (bourgeonnement), mode le plus connu et le mieux décrit, ou encore par septation ou intussusception (figure 25). Ces différentes réponses ont été observées au cours de l'angiogenèse développementale ainsi que dans différents tissus adultes suite à une injection de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Pettersson et al., 2000). Dans les tumeurs vascularisées, tous ces différents modes d'angiogenèse sont possibles, ainsi que d'autres modes impliquant la participation des cellules tumorales qui peuvent se différencier en cellules endothéliales, mimer ces dernières ou encore coopérer avec elles dans la formation de nouveaux vaisseaux (Carmeliet and Jain, 2011).

L'angiogenèse par septation ainsi que par intussusception permettent à un vaisseau de se diviser avec moins de prolifération cellulaire, et facilitent le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces deux modes semblent peu courants et sont peu étudiés, leurs mécanismes moléculaires restent mal définis, au contraire de l'angiogenèse par « sprouting ». Cette dernière correspond à une pousse de capillaire sanguin à partir d'un vaisseau, formant de nouveaux capillaires plus vulnérables que par les autres modes d'angiogenèse, expliquant pourquoi ils constituent une cible privilégiée de l'angiogenèse tumorale. Nous préciserons les mécanismes de ce mode dans la partie suivante.

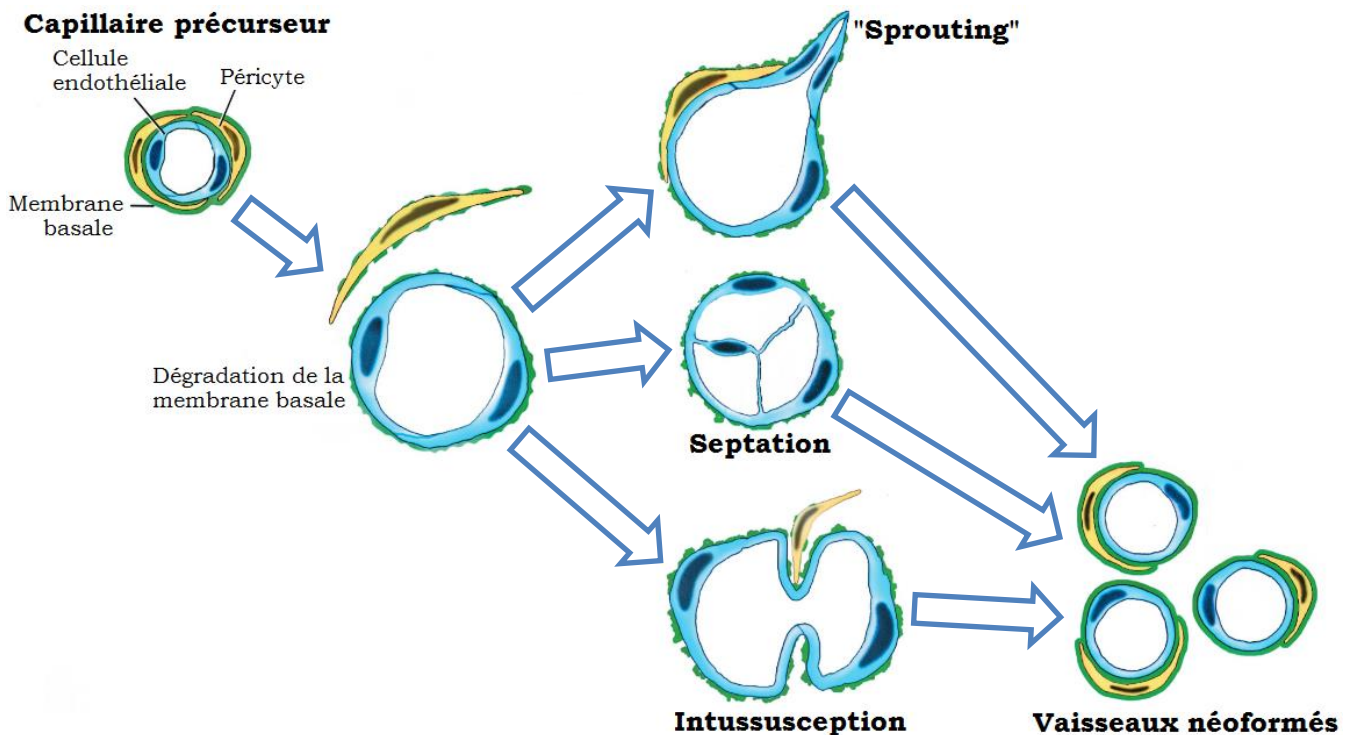


Figure 25 : Différents modes d'angiogenèse peuvent se mettre en place dans les tissus adultes après injection de VEGF. D'après Pettersson et al., 2000.

2) Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse par « sprouting »

Les différentes étapes de la formation d'un nouveau vaisseau par « sprouting » sont illustrées sur la figure 26. Les signaux angiogéniques qui vont initier le processus peuvent être induits par une cellule hypoxique, inflammatoire ou cancéreuse. Dans le cadre de cette thèse, des signaux hypoxiques générés par des neurones activés lors de la tâche mnésique seraient les déclencheurs les plus probables d'une éventuelle angiogenèse. Les facteurs inductibles par hypoxie (HIF, Hypoxia-Inducible Factor) HIF-1 α et HIF-2 α sont en temps normal hydroxylés par les prolyl-hydroxylases PHD, ce qui conduit à leur dégradation. En conditions hypoxiques (ainsi que dans un environnement tumoral non hypoxique) au contraire, les PHDs deviennent inactives, les

protéines HIFs initient alors des régulations transcriptionnelles conduisant à la surexpression de facteurs angiogéniques tels que le VEGF. **HIF-1 α** promeut généralement la pousse d'un nouveau vaisseau alors que HIF-2 α est associé à la maintenance vasculaire. HIF-1 α apparaît comme un marqueur prédominant d'hypoxie médiant la surexpression du VEGF.

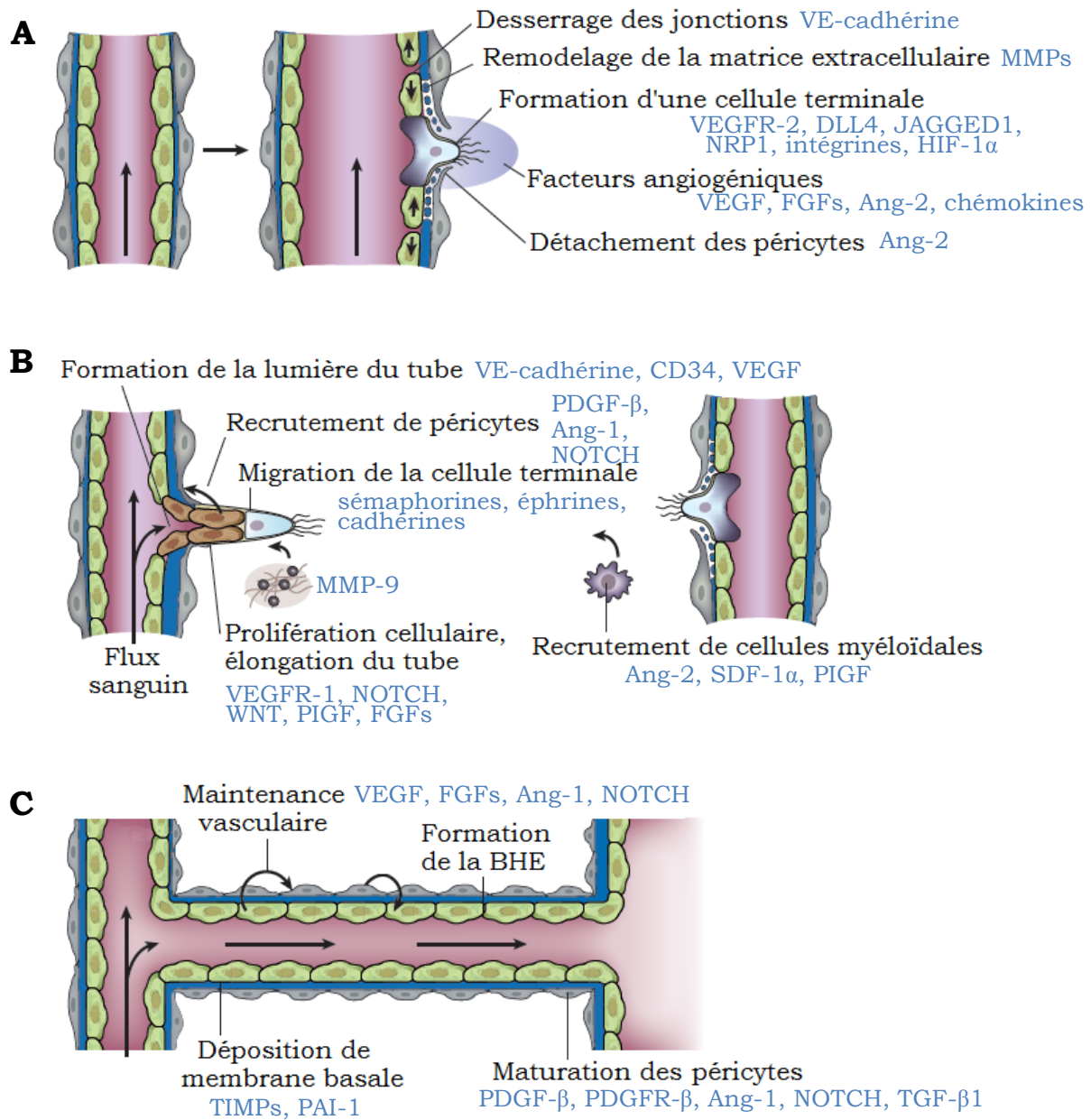


Figure 26 : Etapes de l'angiogenèse par « sprouting » et acteurs moléculaires (en bleu). **(A)** Après stimulation par des facteurs angiogéniques, le vaisseau se dilate et une cellule terminale est sélectionnée. **(B)** Celle-ci migre vers des facteurs de guidance tandis que les cellules endothéliales prolifèrent pour former le début du tube vasculaire. Ces tubes se joignent alors afin de former un néovaisseau pouvant être perfusé. **(C)** Ces néovaisseaux sont alors stabilisés par des péricytes. Le rétablissement des jonctions serrées, la production de maintenance vasculaire, la maturation des péricytes et la déposition de membrane basale assurent ensuite un phénotype de vaisseau mature au capillaire nouvellement formé. D'après Carmeliet and Jain, 2011.

L'une des phases les plus précoces du processus angiogénique correspond au remodelage de la matrice extracellulaire par dégradation de la membrane basale (figure 26A). Les acteurs principaux de ce processus sont les métalloprotéases matricielles (**MMPs**), pouvant être surexprimées par le VEGF. Les MMPs les plus abondantes au sein du cerveau sont MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (pour revues voir Ethell and Ethell, 2007 et Deryugina and Quigley, 2010), qui sont toutes trois impliquées lors du développement ainsi que dans différentes pathologies. **MMP-2** et **MMP-9** sont surexprimées durant le « switch » angiogénique tumoral, mais seule MMP-9 semble y jouer un rôle fonctionnel ; de plus elle permet la libération de facteurs angiogéniques (VEGF, FGFs) de la matrice extracellulaire qu'elle dégrade (figure 2B). MMP-9 joue en outre un rôle clé dans l'angiogenèse post-ischémie médiée par les progéniteurs de cellules endothéliales (Morancho et al., 2013). Dans leur état basal, les cellules endothéliales expriment peu les MMPs à l'exception de MMP-2, alors que durant la formation d'un nouveau vaisseau par « sprouting » au sein d'une tumeur, les cellules endothéliales activées surexpriment MMP-1, MMP-9 et MMP-14.

Le **VEGF** (aussi appelé VEGF-A) est sans conteste l'acteur prédominant du processus angiogénique, le stimulant aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques par une signalisation via le récepteur au VEGF de type 2, **VEGFR-2**. Les neuropilines NRP1 et NRP2 sont des corécepteurs du VEGF, pouvant augmenter l'activité de VEGFR-2 ou signaler indépendamment. En réponse au gradient de VEGF, la cellule terminale surexprime DLL4 qui active NOTCH au sein des cellules endothéliales formant le début du tube vasculaire à la suite de celle-ci ; cela provoque la sous-expression de VEGFR-2 au sein de ces cellules, les rendant moins réceptives au VEGF, assurant ainsi que la cellule terminale prenne seule la tête du futur vaisseau sanguin (voir aussi Quaegebeur et al., 2011). Le VEGF augmente les embranchements vasculaires mais son action purement paracrine (par exemple dans les tumeurs) génère des vaisseaux anormaux, beaucoup moins organisés, alors que le VEGF autocrine libéré par les cellules endothéliales maintient l'homéostasie vasculaire. Le VEGF-C, ligand de VEGFR-2 et VEGFR-3, active la cellule terminale vasculaire. VEGFR-3 est nécessaire à la formation du réseau vasculaire au cours de l'embryogenèse, mais devient par la suite un régulateur clé de la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques ; enfin, le rôle de VEGFR-1 dans l'angiogenèse reste difficile à cerner (pour une revue sur les différentes formes de VEGF et leurs récepteurs, voir O'Rock et al., 2007).

Les angiopoïétines **Ang-2** et **Ang-1** se lient toutes deux au récepteur **Tie2**, Ang-1 fonctionne comme un agoniste favorisant la maturation et la stabilisation des vaisseaux, alors qu'Ang-2 fonctionne comme un antagoniste compétitif de Ang-1 induisant leur déstabilisation, conduisant à l'angiogenèse en présence de VEGF ou

d'autres facteurs de croissance et à leur régression en l'absence de tels facteurs (Maisonpierre et al., 1997). Ainsi, la balance Ang-2/Ang-1 contrôle la stabilité des vaisseaux (figure 27).

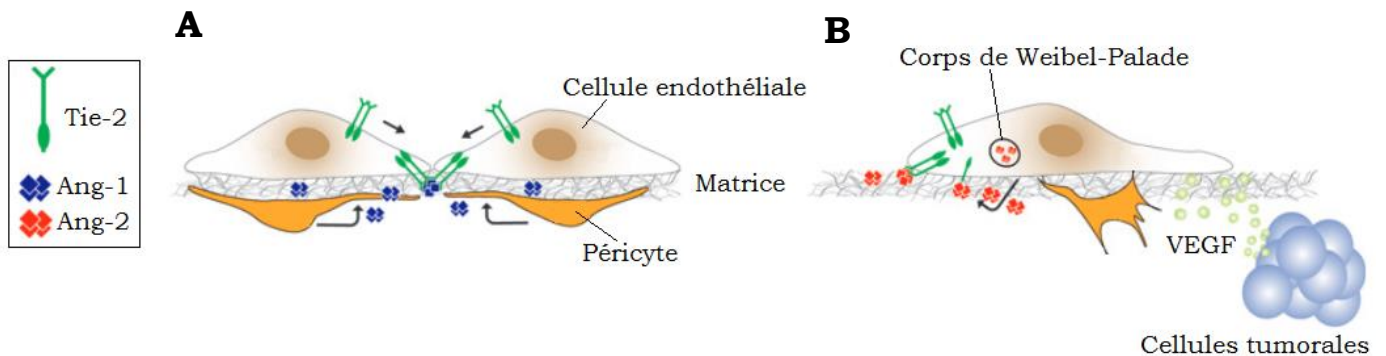


Figure 27 : Angiopoïétines et stabilité des vaisseaux. **(A)** Les vaisseaux matures sont couverts de péricytes sécrétant Ang-1, qui induit le regroupement des récepteurs Tie2 et leur activation au niveau des jonctions serrées, promouvant ainsi la survie cellulaire et la stabilisation du vaisseau, et garantissant une barrière hémato-encéphalique (BHE) fonctionnelle. **(B)** Sous l'influence de signaux angiogéniques des cellules tumorales, Ang-2 est libéré des corps de Weibel-Palade, conduisant au détachement des péricytes et à la perte d'intégrité de la BHE. Les interactions cellule-matrice sont médiées par les complexes Tie2-Ang2 au cours de la migration cellulaire. D'après Saharinen et al., 2011.

Ang-2 est produite par la cellule terminale et les cellules endothéliales proliférantes lors du « sprouting » et peut être induite *in vitro* en conditions hypoxiques par le VEGF (Pichiule et al., 2004). Ang-2 est aussi stockée dans les corps de Weibel-Palade endothéliaux desquels elle peut être rapidement libérée. Cependant ce stockage ne semble pas être impliqué dans l'angiogenèse physiologique (Fiedler et al., 2004) mais serait susceptible de jouer un rôle dans des réponses plus rapides des cellules endothéliales, par exemple liées à la coagulation, à l'inflammation ainsi que dans un environnement tumoral (Saharinen et al., 2011). Ang-2 (inductible) et Tie2 (exprimé de façon basale) sont généralement considérés comme étant spécifiques des cellules endothéliales, ce qui n'est pas complètement vrai puisque les fibroblastes (Lee et al., 2007) et les astrocytes des glioblastomes avancés (Audero et al., 2001) pourraient exprimer Ang-2, et Tie2 serait exprimé par les cellules épendymaires (Horton et al., 2010) ainsi que par les astrocytes en culture (Zacharek et al., 2007). La littérature s'accorde tout de même pour dire qu'Ang-2 n'est exprimée par les cellules endothéliales que dans les zones de remodelage vasculaire.

Beaucoup d'autres acteurs moléculaires entrent bien sûr en jeu (voir par exemple la figure 26), nous avons ici mis l'accent sur ceux que nous avons étudiés plus en détail dans ce chapitre et le suivant. Hif-1 α est intéressant en tant qu'inducteur potentiel de

phénomènes angiogéniques ; les MMPs sont des acteurs très précoces du processus et peuvent ainsi nous permettre de détecter des changements survenant rapidement ; le VEGF et ses récepteurs sont des acteurs incontournables de l'angiogenèse ; enfin le système Ang-2/Tie2 présente une spécificité vasculaire intéressante sur laquelle nous appuierons dans le chapitre suivant.

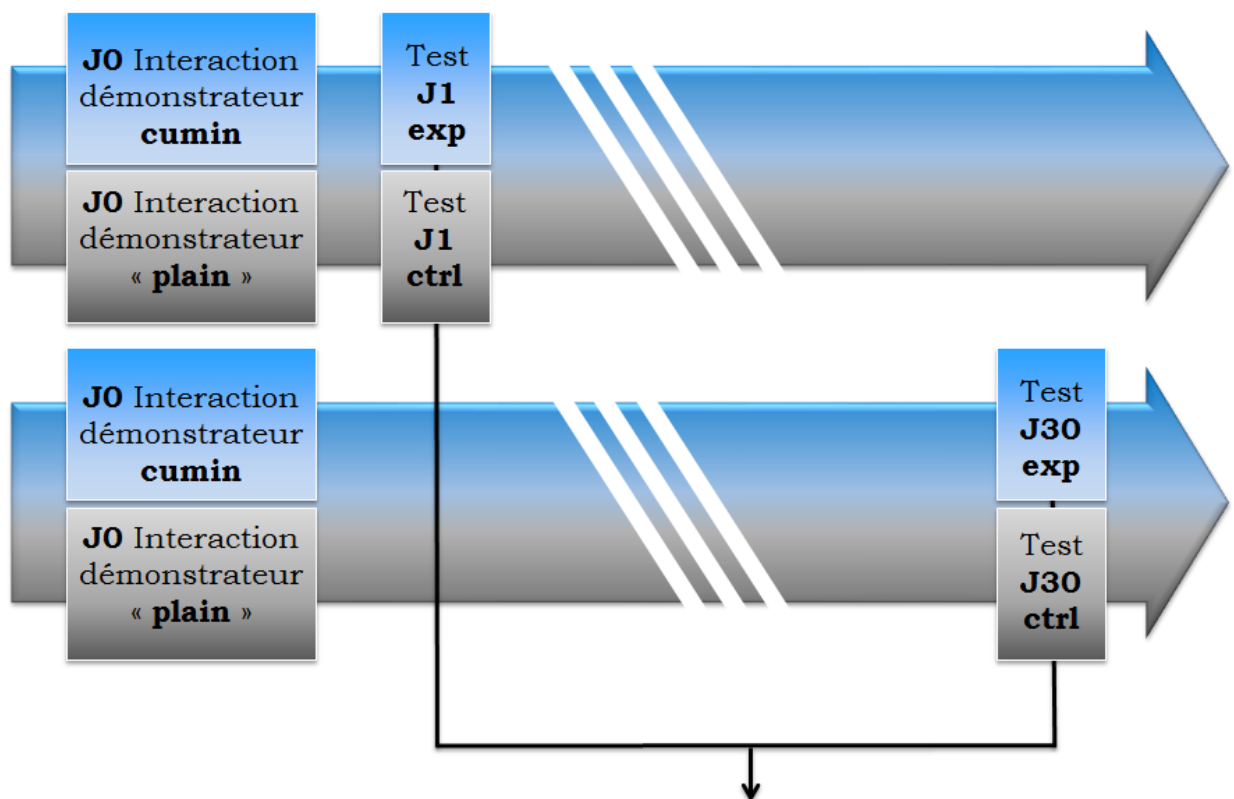
Soulignons enfin que les mécanismes décrits ci-dessus reposent essentiellement sur des études d'angiogenèse développementale et tumorale. Ainsi, il faut garder à l'esprit que le champ que nous explorons dans ce chapitre est susceptible de dépendre de mécanismes moléculaires qui ne soient pas exactement les mêmes, voire de modes d'angiogenèse qui ne se fassent pas uniquement par « sprouting ».

II. Changements de densité de vaisseaux sanguins et de densité d'embranchements vasculaires au cours de la consolidation mnésique

1) Protocole expérimental

L'objectif de cette expérience est de tester l'hypothèse que des changements structuraux (densité vasculaire, densité d'embranchements de vaisseaux sanguins) surviennent dans nos régions cérébrales d'intérêt au cours de la consolidation mnésique. Nos groupes de rats sont identiques à ceux du chapitre précédent, les rats expérimentaux (**exp**) interagissent avec un démonstrateur ayant mangé du cumin, et les rats témoins (**ctrl**) interagissent avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle (« plain »), et n'encodent donc pas de nouvelle mémoire olfactive associative.

Ces rats sont testés soit 1 jour après l'interaction (**J1**), délai auquel l'hippocampe est impliqué dans le rappel de la mémoire récente, soit 30 jours après (**J30**), délai auquel les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur sont impliqués dans le rappel de la mémoire ancienne.



Perfusion, coupe du cerveau, analyse de la densité de vaisseaux sanguins et de la densité d'embranchements vasculaires

Figure 28 : Design expérimental.

Une heure trente après le test, les rats de ces 4 groupes sont perfusés, leur cerveau est prélevé puis coupé en tranches frontales de 40 μ m. Celles-ci sont ensuite marquées à la lectine-FITC afin de visualiser le réseau vasculaire dans nos régions d'intérêt (voir matériels et méthodes pour les détails), ainsi que dans le cortex pariétal qui n'est nécessaire au rappel mnésique ni à J1 ni à J30 et nous sert donc de région témoin.

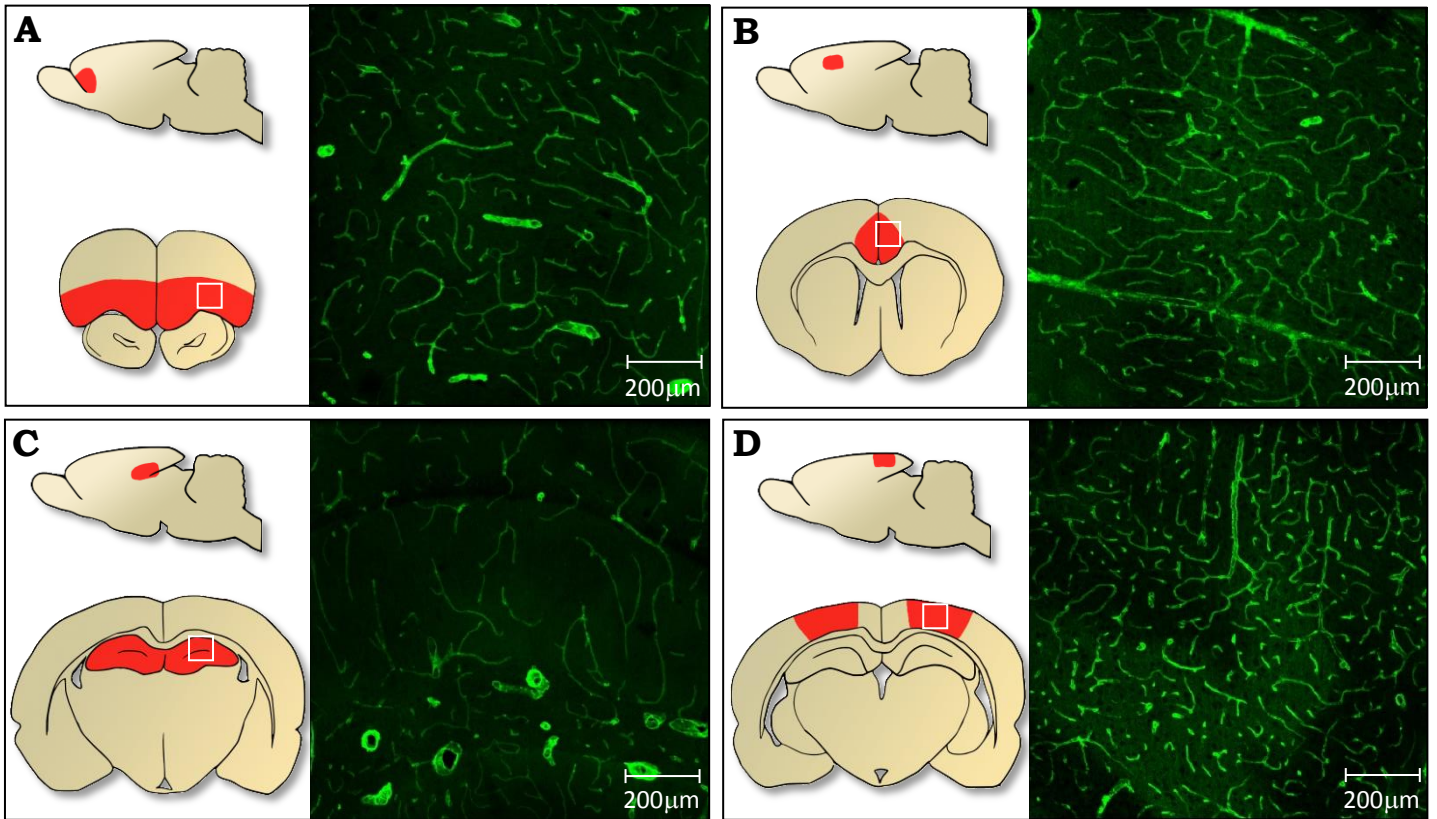


Figure 29 : Images représentatives du marquage du réseau vasculaire dans **(A)** le cortex orbitofrontal, **(B)** le cortex cingulaire antérieur, **(C)** l'hippocampe dorsal et **(D)** le cortex pariétal. Chaque région est représentée en rouge sur une coupe sagittale (en-haut) et frontale (en-bas).

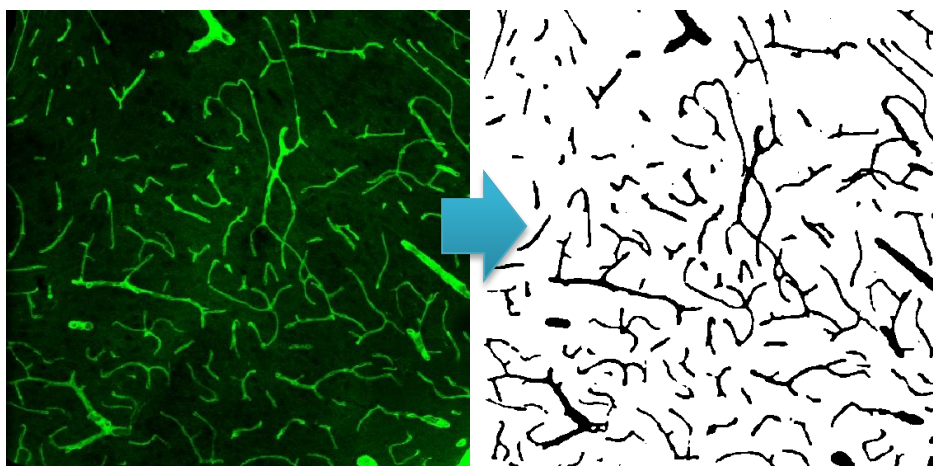


Figure 30 : Traitement des images (à gauche, zone de cortex orbitofrontal) sous ImageJ afin de pouvoir facilement calculer la densité vasculaire (le pourcentage de la surface 2D occupée par des vaisseaux) sur l'image traitée (à droite).

En analysant une coupe sur 5 (une tous les 200µm), nous avons calculé à partir de ces images la densité de vaisseaux sanguins (figure 30) et la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins pour chacune de ces 4 régions pour chaque rat. Ainsi, *ce protocole permet de révéler d'éventuelles modifications de la structure du réseau vasculaire au cours de la consolidation mnésique.*

2) Résultats comportementaux

Les quelques rats n'ayant pas obtenu de bonnes performances comportementales ont ici encore été écartés, de même que ceux dont la qualité de la perfusion (et donc des marquages) n'était pas satisfaisante. Nous avons analysé les 8-9 rats les plus représentatifs de chaque condition.

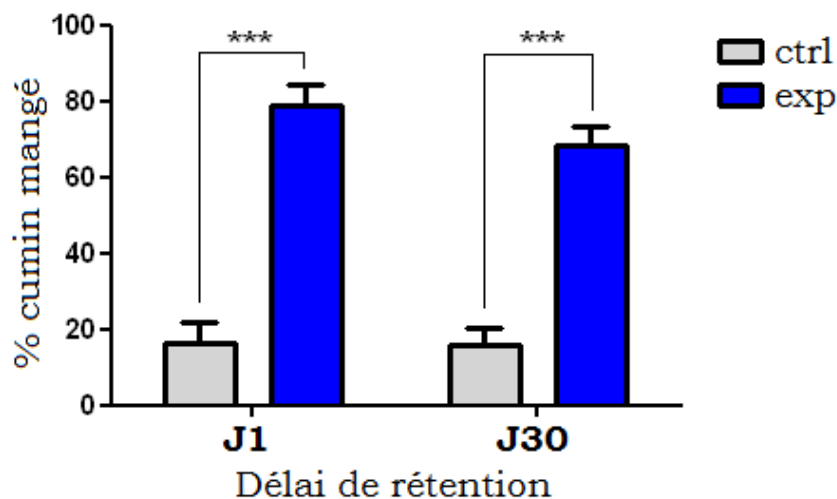


Figure 31 : Résultats de la tâche de TSPA. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention (choix entre de la nourriture aromatisée au thym ou au cumin) par les rats témoins (ctrl) et expérimentaux (exp) analysés ensuite pour la densité de vaisseaux et d'embranchements vasculaires. *** $p < 0,001$ versus ctrl, test post-hoc de Bonferroni. $n = 8-9$ rats par groupe.

La figure 31 présente les performances à la tâche de TSPA des rats utilisés, avec des profils d'apprentissage similaires à ceux qui ont été utilisés en imagerie calcique dans le chapitre précédent. Les rats des groupes contrôles ayant interagi avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture non aromatisée ont montré une préférence innée pour le thym, similaire pour les deux délais de rétention, et cette préférence a été inversée chez les groupes expérimentaux suite à l'interaction avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture aromatisée au cumin. Une analyse de variance à deux facteurs a révélé que cette préférence acquise pour le cumin était significativement différente du hasard (ANOVA, effet groupe, $F(1,30) = 123,1$; $p < 0,0001$) et similaire aux deux délais de rétention (interaction groupe x délai, $F(1,30) = 0,84$; $p = 0,369$; NS). Cela

montre que l'information acquise dans cette tâche est durable et insensible à l'oubli sur la durée de notre étude.

Nous avons à nouveau contrôlé la quantité totale de nourriture consommée au cours du test de préférence (figure 32).

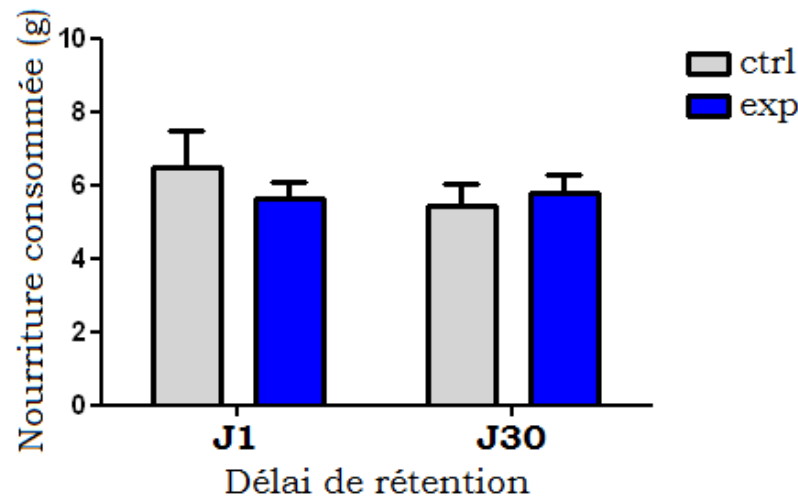


Figure 32 : Quantité totale de nourriture consommée (cumin + thym) au cours du test de préférence par les rats analysés ensuite. n=8-9 rats par groupe.

Aucune différence significative dans la quantité totale de nourriture consommée lors des séances de rétention n'a été observée entre les groupes (ANOVA, $F(1,30)=0,138$; $p=0,713$; NS). Les différences de performances observées entre les groupes ne sont donc pas la conséquence de disparités dans le niveau de motivation des animaux lors du test de préférence.

3) Analyse de la densité vasculaire

Les résultats de l'analyse de la densité vasculaire au sein des 4 structures cérébrales précédemment citées sont présentés sur la figure 33 en page suivante. En raison de la faible ampleur de l'effet combinée à la petite taille de nos échantillons, aucun effet groupes expérimentaux versus contrôles ne ressort statistiquement par analyse de variance à deux facteurs (ANOVA, effet groupe, cortex orbitofrontal (COF) $F(1,30)=2,87$; $p=0,101$ / cortex cingulaire antérieur (CCA) $F(1,30)=2,23$; $p=0,146$ / hippocampe dorsal (HD) $F(1,30)=2,08$; $p=0,160$). Pour autant, il est remarquable qu'une même tendance se dégage dans nos trois structures d'intérêt, une tendance à l'augmentation de la densité vasculaire chez les rats expérimentaux à J1, alors qu'un tel effet n'est pas visible dans notre structure témoin, le cortex pariétal (ANOVA, effet groupe, cortex pariétal (CP) $F(1,30)=0,403$; $p=0,531$; NS).

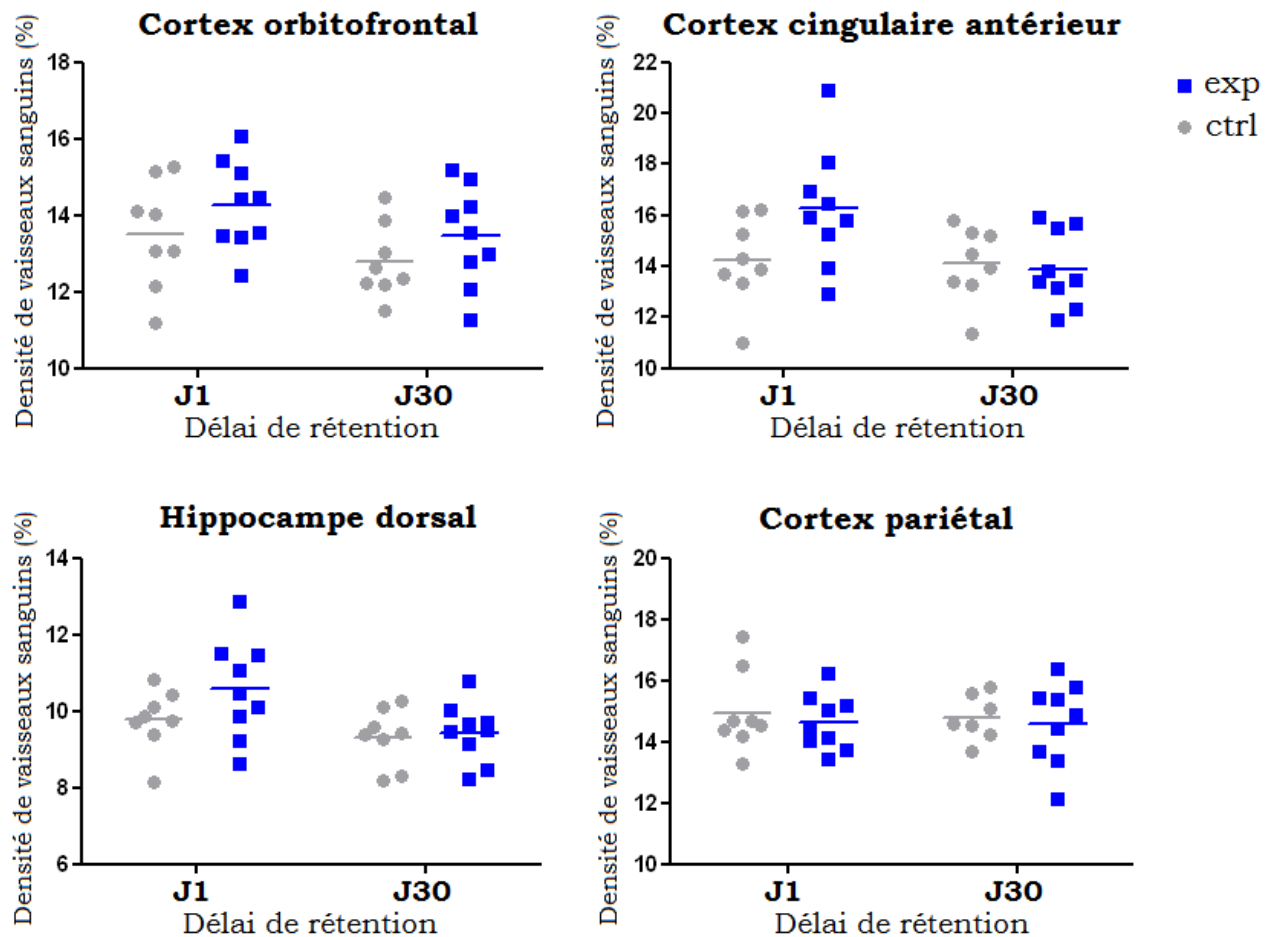


Figure 33 : Densité de vaisseaux sanguins au sein de 4 structures cérébrales de rats expérimentaux (en bleu) et contrôles (en gris). n=8-9 rats par groupe.

Cet effet semble transitoire au sein du cortex cingulaire antérieur (interaction groupe x délai, CCA $F(1,30)=3,30$; $p=0,079$; proche du seuil de significativité), ce qui est beaucoup moins net dans le cas de l'hippocampe dorsal et du cortex orbitofrontal (interaction groupe x délai, HD $F(1,30)=1,08$; $p=0,306$ / COF $F(1,30)=0,012$; $p=0,91$; NS).

Ces résultats semblent indiquer une augmentation transitoire du réseau vasculaire au sein du cortex cingulaire antérieur et de l'hippocampe dorsal au début du processus de consolidation mnésique. Cependant, le nombre d'animaux utilisé dans cette expérience doit être augmenté afin que ce résultat soit validé par le test statistique.

Une augmentation de densité vasculaire peut refléter deux modifications distinctes : une dilatation des vaisseaux et/ou la création de nouveaux vaisseaux par angiogenèse. Afin de faire la distinction entre ces deux possibilités, nous avons analysé la densité d'embranchements vasculaires, dont une augmentation ne devrait en théorie que refléter un phénomène angiogénique, et pas une simple dilatation vasculaire.

4) Analyse de la densité d'embranchements vasculaires

Les résultats de l'analyse de la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins au sein des quatre mêmes structures cérébrales sont présentés en figure 34.

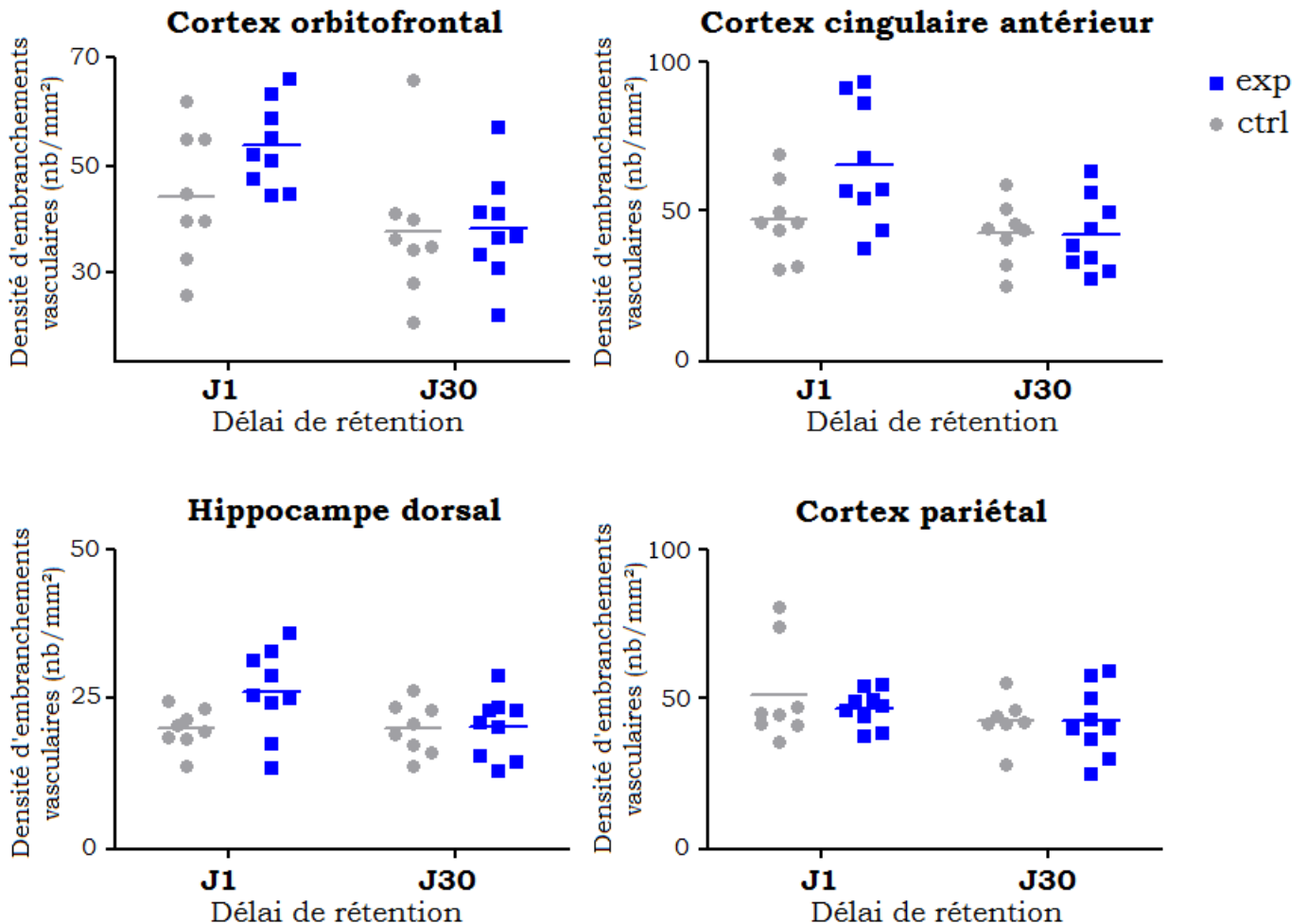


Figure 34 : Densité d'embranchements vasculaires au sein de 4 structures cérébrales de rats expérimentaux (en bleu) ou contrôles (en gris). n=8-9 rats par groupe.

Ici encore, aucun effet groupes expérimentaux versus contrôles ne ressort statistiquement par analyse de variance à deux facteurs, cependant on se rapproche fortement du seuil de significativité dans le cas de l'hippocampe dorsal et du cortex cingulaire antérieur (ANOVA, effet groupe, COF $F(1,30)=1,83$; $p=0,187$ / CCA $F(1,30)=2,97$; $p=0,095$; proche du seuil de significativité / HD $F(1,30)=3,13$; $p=0,087$; proche du seuil de significativité). A nouveau, une même tendance se dégage dans nos trois structures d'intérêt, c'est-à-dire une augmentation de la densité d'embranchements vasculaires chez les rats expérimentaux à J1, alors qu'aucun effet ne se retrouve dans notre structure témoin, le cortex pariétal (ANOVA, effet groupe, $p=0,573$; NS). Il semble clair sur ces graphes que cette augmentation ne perdure pas

dans le temps (ANOVA, interaction groupe x délai, COF $F(1,30)=1,36$; $p=0,253$ / CCA $F(1,30)=3,39$; $p=0,076$; proche du seuil de significativité / HD $F(1,30)=2,55$; $p=0,121$).

5) Conclusion

L'induction d'une nouvelle mémoire olfactive associative par interaction sociale semble provoquer une augmentation de la densité vasculaire et de la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins au sein des cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur et de l'hippocampe dorsal dès le jour qui suit l'apprentissage. Bien que ces expériences doivent être répliquées, cela suggère qu'une angiogenèse se met en place précocement dans ces régions, dès le début du processus de consolidation mnésique. Afin de confirmer cela, nous avons étudié la prolifération cellulaire dans ces régions dès les premiers jours qui suivent l'interaction sociale.

III. Etude de la prolifération cellulaire au début du processus de consolidation mnésique

1) Protocole expérimental

L'objectif de cette expérience est de vérifier s'il y a bien prolifération de cellules endothéliales (et donc angiogenèse) en début de processus de consolidation mnésique, comme le suggère l'expérience précédente. Pour cela, nous utilisons 2 groupes de rats : des rats expérimentaux (**exp**) interagissant avec un démonstrateur ayant mangé du cumin et des rats témoins (**ctrl**) interagissant avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle non aromatisée. Tous les rats reçoivent durant les 3 premiers jours suivant l'interaction sociale des injections intrapéritonéales répétées de 5-Bromo-2'-déoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine s'incorporant dans l'ADN des cellules en division et pouvant ensuite être révélé par marquage immunohistochimique.

Ils sont ensuite euthanasiés puis perfusés à J3 sans réaliser au préalable le test de préférence alimentaire. Cela vise à s'assurer que les changements structuraux précoces observés ne sont pas dus uniquement au rappel de l'information. Le délai de 3 jours a été choisi afin de pouvoir révéler un marquage BrdU vasculaire plus important que lorsque les rats sont sacrifiés dès J1. On s'attend en effet à ce que le développement du réseau vasculaire se poursuive au moins durant quelques jours, l'observation de phénomènes angiogéniques se faisant généralement plusieurs jours après l'induction du processus (voir par exemple Hagedorn et al., 2004).

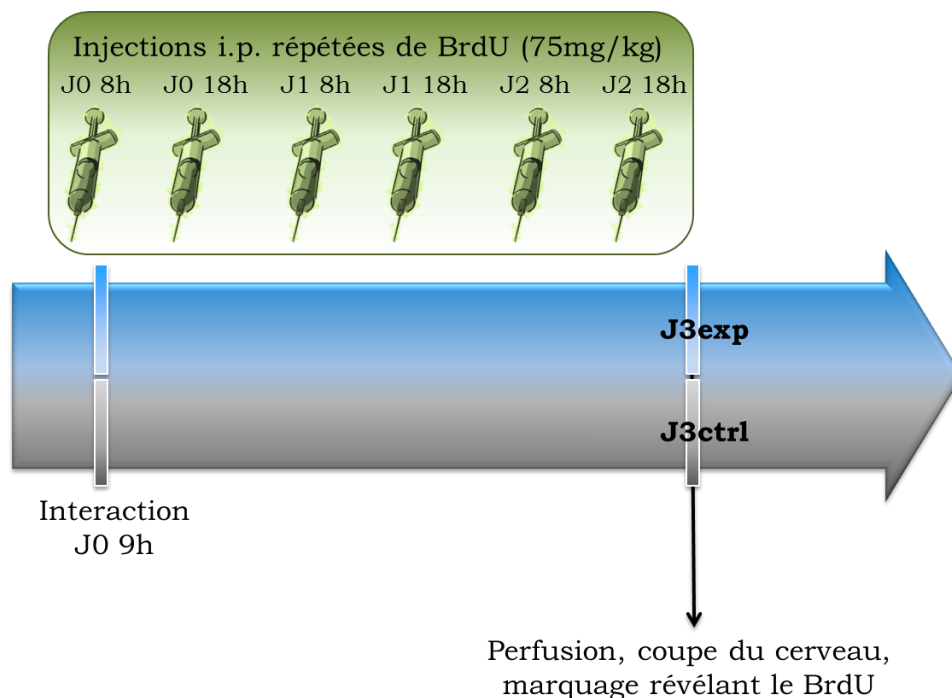


Figure 35 : Design expérimental.

2) Résultats du double marquage BrdU / Collagène IV

Pour chaque rat, 4 zones ont été analysées : COF, CCA, ainsi que le gyrus denté (GD) et le CA1 au sein de l'hippocampe dorsal (voir figure 36). Nous avons analysé 4 zones par région cérébrale d'intérêt, en comptant le nombre de noyaux co-marqués au BrdU (révélant les cellules proliférantes entre J0 et J3) et au Collagène IV (protéine spécifique des lames basales, synthétisée au sein du cerveau par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, révélant le réseau vasculaire mature et en début de formation).

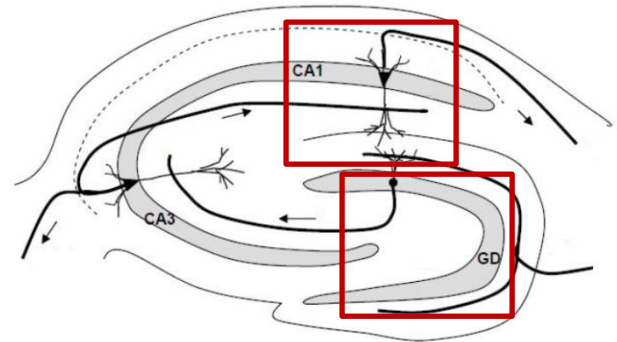


Figure 36 : Hippocampe de rat, et ses différentes régions : CA1, CA3, et le gyrus denté (GD).

Les résultats sont présentés en figure 37, ils restent cependant provisoires. Nous essayons encore d'optimiser le protocole afin de pouvoir analyser les régions dans leur entièreté par une approche stéréologique, et d'éviter de compter certains marquages BrdU vasculaires non spécifiques apparaissant sur des vaisseaux visiblement mal perfusés. Un rat expérimental a été retiré de l'étude, en raison d'une mauvaise perfusion rendant les marquages dans certaines zones difficilement interprétables, et d'un profil de double marquage très différent des autres rats expérimentaux. Notons tout de même que l'inclure ou non dans l'étude ne change rien aux résultats après test statistique.

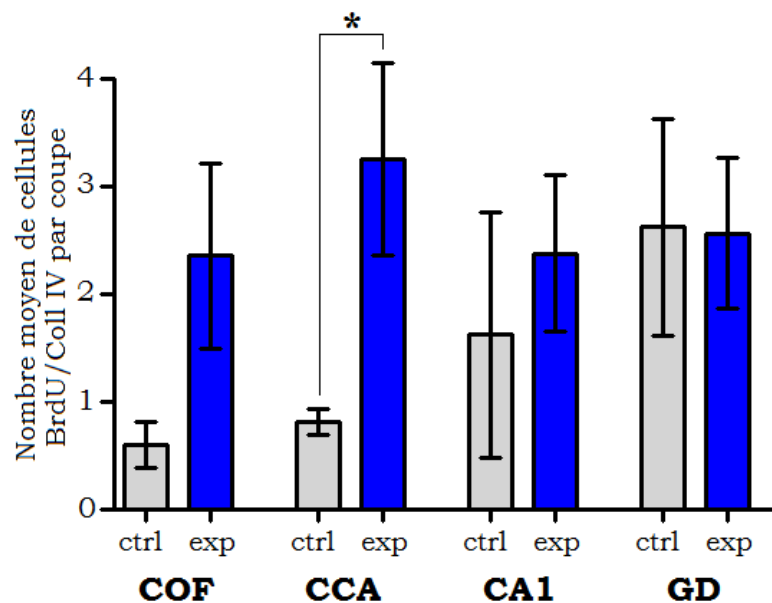


Figure 37 : Nombre moyen par coupe de cellules doublement marquées au BrdU et au Collagène IV (autrement dit de cellules vasculaires ayant proliféré entre J0 et J3), pour des rats expérimentaux (exp) ou contrôles (ctrl). n=4 rats par groupe. * $p < 0,05$, test de Mann Whitney.

Dans les zones corticales, la prolifération vasculaire « de base » observée chez les rats contrôles est quasiment inexistante : elle correspond à moins d'une cellule par zone imagée de $8,1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ de volume. Chez les rats expérimentaux, on observe une augmentation de la prolifération de cellules vasculaires dans le CCA (+300%, test de Mann Whitney $p=0,029$), et une même tendance ne ressortant pas statistiquement se dessine dans le COF (+289%, test de Mann Whitney $p=0,20$).

Aucun effet expérimental versus contrôle n'apparaît au sein du gyrus denté, région classiquement étudiée dans le cadre de la neurogenèse. Ainsi, l'angiogenèse hippocampique mise en évidence dans la partie précédente (dans laquelle l'hippocampe entier a été analysé) semble se dérouler en-dehors des niches neurogéniques du gyrus denté, où on aurait pourtant pu la suspecter. Cela aurait lieu éventuellement légèrement dans le CA1 (+46%, test de Mann Whitney $p=0,47$), à vérifier avec des rats supplémentaires, ou dans la zone la plus latérale vers les couches neuronales CA2 et CA3. Quelques images prises dans le CA2 semblent indiquer que c'est bien le cas, mais les comptages systématiques restent à faire.

Les figures 38 et 39 correspondent à des images obtenues respectivement au sein du cortex cingulaire antérieur et du gyrus denté.

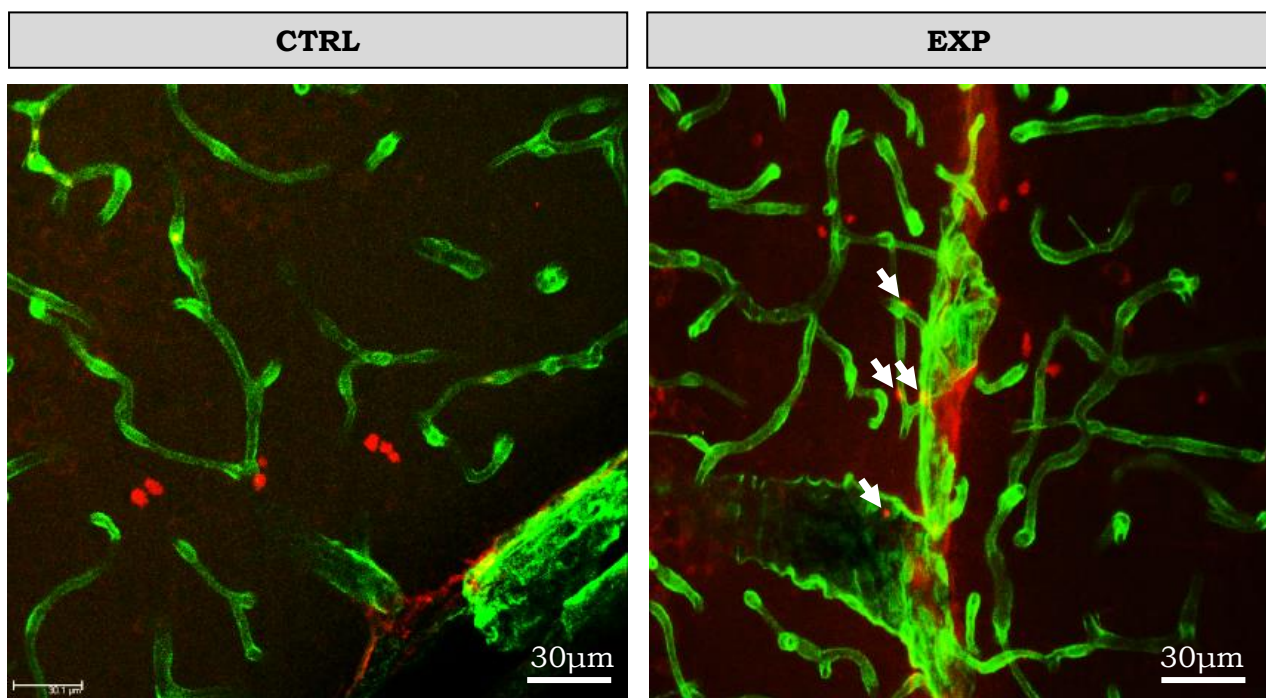


Figure 38 : Prolifération cellulaire (marquage BrdU en rouge) au sein du cortex cingulaire antérieur, chez un rat contrôle (à gauche) et expérimental (à droite). Le réseau vasculaire est marqué en vert (marquage Collagène IV). Les cellules vasculaires proliférantes sont indiquées par une flèche blanche (vérifié systématiquement à un grossissement plus fort afin de déterminer si les points BrdU sont ou non localisés au niveau de la paroi des vaisseaux).

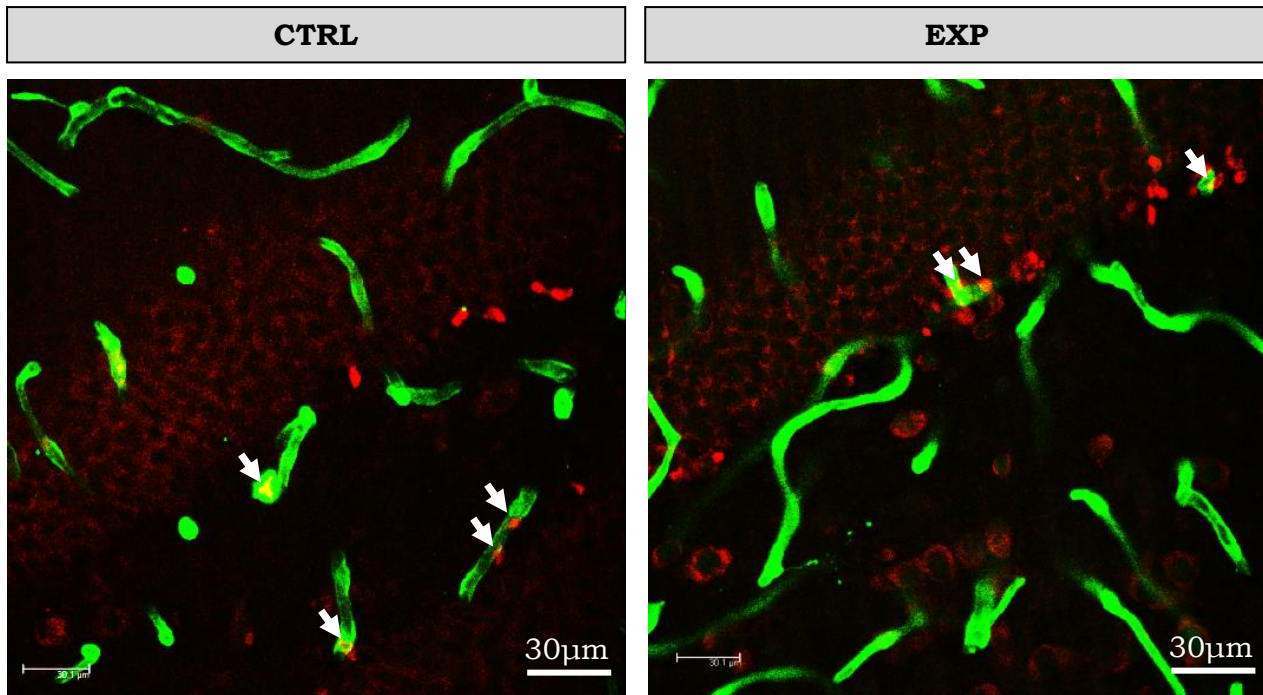


Figure 39 : Prolifération cellulaire (marquage BrdU en rouge) au sein du gyrus denté, chez un rat contrôle (à gauche) et expérimental (à droite). Le réseau vasculaire est marqué en vert (marquage Collagène IV). Les cellules vasculaires proliférantes sont indiquées par une flèche blanche.

3) Conclusion

Cette expérience confirme qu'une angiogenèse se met en place en début de consolidation mnésique (J0 à J3) au sein du cortex cingulaire antérieur. Une même tendance apparaît aussi dans le cortex orbitofrontal, mais ici encore des rats supplémentaires seraient à prévoir pour qu'elle ressorte statistiquement. L'effet est net car il s'agit de régions où la prolifération de cellules vasculaires est quasiment inexistante à l'état basal (rats contrôles).

Aussi, il apparaît que l'angiogenèse hippocampique précoce n'a pas lieu au sein du gyrus denté, zone de neurogenèse, mais donc plutôt à l'extérieur de cette zone de niches neuroangiogéniques.

IV. Discussion

Les résultats de ce chapitre suggèrent qu'une angiogenèse se met en place dès les premiers jours qui suivent l'interaction sociale, dans l'hippocampe dorsal aussi bien que dans nos régions corticales d'intérêt, et que l'augmentation de densité vasculaire qu'elle implique ne perdure pas dans le temps. Cela est particulièrement intéressant dans le cas des cortex cingulaire antérieur et orbitofrontal, qui ne prennent pourtant en charge le souvenir ancien que plusieurs semaines après l'interaction sociale. Ainsi, il semble que cette angiogenèse précoce pourrait jouer un rôle dans la maturation initiale des réseaux neuronaux corticaux qui vont prendre en charge le souvenir et assurer sa stabilisation à long terme.

Au terme de ces 2 premiers chapitres d'étude corrélative, nous mettons en évidence une dissociation entre la réactivité et l'architecture du réseau vasculaire, dont les adaptations au cours du processus de consolidation mnésique diffèrent (figure 40). Comme souligné au chapitre précédent, il semble que la dynamique des artères piales cérébrales s'adapte à l'utilisation du souvenir et pourrait permettre leur expression : des modifications de signalisation calcique sont observées au sein des ACP à J1, lorsque l'hippocampe qu'elles irriguent est impliqué dans le rappel de la mémoire récente, alors que des modifications de signalisation calcique sont observées au sein des ACA à J30, lorsque les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur qu'elles irriguent sont impliqués dans le rappel de la mémoire ancienne.

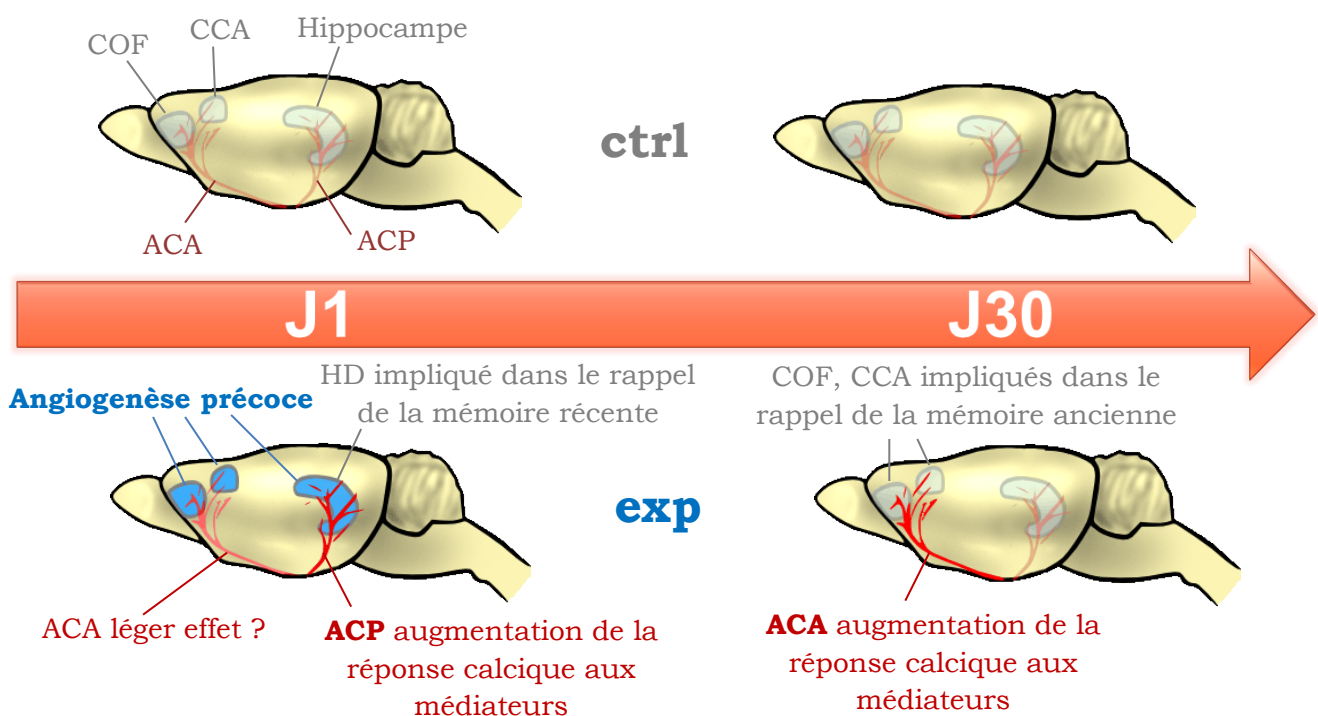


Figure 40 : Schéma récapitulatif des 2 premiers chapitres de résultats.

Rôle d'une angiogenèse précoce ?

Lesburguères et al. (2011) ont mis en évidence un processus d'étiquetage des assemblées neuronales néocorticales activées au moment de l'encodage permettant par la suite à l'hippocampe de les réactiver spécifiquement durant le dialogue hippocampo-cortical. Ainsi, même s'ils ne sont pas nécessaires au rappel de la mémoire récente à J1, les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur ont déjà subi ce processus précoce d'étiquetage. De plus, les auteurs montrent que dès J1, on observe une augmentation du nombre d'épines dendritiques sur les neurones du cortex orbitofrontal de rats expérimentaux par rapport aux témoins (figure 41). Ainsi, il n'est pas vraiment étonnant d'observer des modifications vasculaires aussi précoces dans ces régions corticales. Elles pourraient permettre de suppléer à une plus forte demande métabolique lors de la mise en place de nouvelles épines dendritiques impliquées dans le stockage de l'information au niveau cortical.

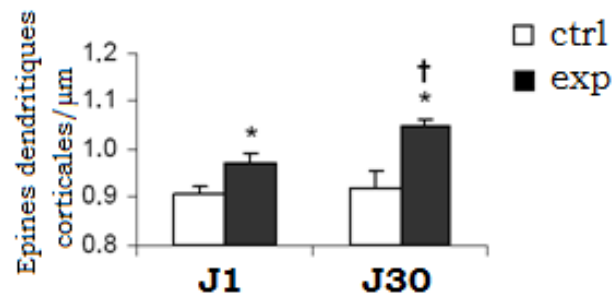


Figure 41 : Densité d'épines dendritiques mesurée sur des neurones du cortex orbitofrontal, chez des rats témoins (ctrl) et expérimentaux (exp) ayant participé à la tâche de TSPA, 1 jour ou 30 jours après l'interaction. * $p < 0,05$ versus ctrl, † $p < 0,05$ versus J1 exp. D'après Lesburguères et al., 2011.

L'idée que la plasticité neuronale pourrait être tributaire d'une plasticité du réseau vasculaire a déjà été avancée (Black et al., 1987 ; Wallace et al., 2011) mais jamais démontrée. Allant plus loin, Whiteus et al. (2014) montrent que des déficits vasculaires durables occasionnés lors de la période néonatale et se traduisant par une diminution de la densité vasculaire dans certaines aires corticales réduisent la capacité de celles-ci à faire face à des conditions hypoxiques. En effet, une réduction d'oxygène maintenue durant 48h conduit à la perte d'épines dendritiques se trouvant à plus de 20μm du plus proche capillaire sanguin chez les souris présentant ces déficits vasculaires, et pas chez les souris témoins. Cela souligne l'importance de la microvasculature dans le maintien des épines dendritiques en conditions hypoxiques (et donc aussi lors de fortes demandes métaboliques). De là, on peut émettre l'hypothèse que la création de nouvelles épines dendritiques requiert des ajustements vasculaires locaux permettant d'adapter la distribution de l'oxygène à un réseau neuronal complexifié.

De plus, une étude invasive récente montre que le blocage du processus de formation des épines dendritiques dans le cortex cingulaire antérieur immédiatement après (et non pas tardivement) un apprentissage de la peur associée au contexte empêche la formation de la mémoire à long terme et l'augmentation progressive du nombre d'épines dendritiques associée à ce processus (Vetere et al., 2011). On peut alors avancer l'hypothèse d'une contribution vasculaire précoce qui agirait comme un mécanisme permissif à l'origine de la régulation des épines dendritiques et des modifications d'architecture du réseau neuronal cortical, indispensables à la formation de la mémoire ancienne.

Les nouveaux vaisseaux sont-ils maintenus dans le temps ?

Les données en cours de réplication de densité vasculaire et de densité d'embranchements de vaisseaux sanguins obtenues à J1 et à J30 suggèrent que l'effet vasculaire précoce ne se maintient pas dans le temps. S'il se confirme que ces 2 paramètres diminuent entre J1 et J30 et retrouvent à terme un niveau équivalent à celui des contrôles, cela pourra s'expliquer de deux façons différentes : soit les nouveaux vaisseaux induits par la formation d'une mémoire olfactive associative régressent rapidement (et ne seraient donc utiles qu'en début de consolidation mnésique), soit ils persistent et d'autres capillaires sanguins plus vieux (moins bien situés ?) régressent.

Afin de déterminer le pourcentage de vaisseaux créés en début de consolidation mnésique qui persistent jusqu'à J30, nous avons utilisé le protocole de la partie III (injections répétées de BrdU en début de consolidation mnésique) avec des groupes supplémentaires de rats expérimentaux et contrôles euthanasiés seulement à J30. Comparer le nombre de cellules endothéliales marquées au BrdU chez les groupes J3 et les J30 nous apportera la réponse à cette question. L'expérience comportementale a déjà été réalisée, seuls restent à faire les marquages ; nous espérons obtenir ces résultats au cours des mois à venir.

Argument moléculaire

Aux différents arguments de ce chapitre plaidant pour une angiogenèse précoce dans toutes nos régions d'intérêt, nous avons souhaité ajouter un argument moléculaire en évaluant par PCR quantitative (qPCR) le niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) de certains acteurs de l'angiogenèse décrits dans l'introduction (Hif-1 α , MMP-2, MMP-9, Tie2 et en particulier Ang-2, Ang-1 et le ratio Ang-2/Ang-1) dans différentes structures cérébrales de rats expérimentaux et contrôles euthanasiés le lendemain de l'interaction sociale (sans rappel). Nos données préliminaires, qui seront complétées

d'ici la soutenance de thèse, montrent comme attendu une tendance à l'augmentation du ratio Ang-2/Ang-1 au sein du cortex cingulaire antérieur des rats expérimentaux par rapport aux contrôles ; cette régulation transcriptionnelle devrait faire pencher la balance vers une déstabilisation des vaisseaux et donc vers une initiation de phénomènes angiogéniques.

Contre toute attente, rien de tel n'a été observé au sein du cortex orbitofrontal. Il peut s'agir d'un problème technique : la zone prélevée était plus large que la zone restreinte du COF où avaient été observées les augmentations d'activation neuronale lors du rappel à J30 (Lesburguères et al., 2011), il est ainsi possible qu'un signal angiogénique ait été « dilué » dans nos prélèvements. Une autre explication fait intervenir les corps de Weibel-Palade cités en introduction de ce chapitre : ceux-ci peuvent stocker la protéine Ang-2 et la rendre disponible au moins dans le cadre de l'angiogenèse tumorale (Saharinen et al., 2011). Il est ainsi envisageable qu'une augmentation de la disponibilité de la protéine Ang-2 dans l'environnement de certains vaisseaux ait eu lieu et que cela ait stimulé l'angiogenèse sans qu'il n'y ait encore eu de régulation transcriptionnelle dès J1 au sein du COF, alors qu'une angiogenèse plus massive au sein du CCA et de l'HD pourrait avoir épuisé ces stocks au même délai et donc déjà nécessité une régulation transcriptionnelle concernant Ang-2.

Un signal hypoxique comme déclencheur de l'angiogenèse ?

Nous avançons l'hypothèse qu'un signal hypoxique émanant des neurones impliqués dans le dialogue hippocampo-cortical (et donc régulièrement réactivés) pourrait constituer un signal déclencheur pertinent de l'angiogenèse.

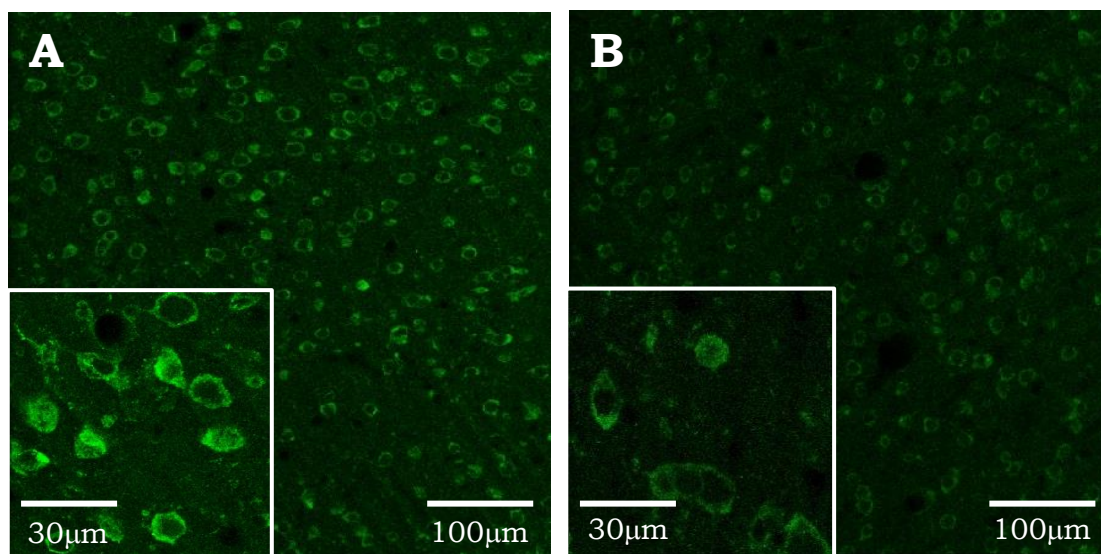


Figure 42 : Immunomarcage de la protéine Hif-1 α sur des coupes de cortex orbitofrontal **(A)** d'un rat expérimental et **(B)** d'un rat contrôle, tous deux testés puis euthanasiés immédiatement après le rappel, 24h après l'interaction sociale.

Nos données de qPCR n'indiquent pas d'augmentation d'ARNm codant pour Hif-1 α chez les rats expérimentaux par rapport aux contrôles à J1. Cela n'est pas étonnant dans la mesure où le signal hypoxique est très rapide et transitoire. Ainsi, le pic d'ARNm se produirait puis se résorberait dans les 3h suivant l'induction de l'hypoxie, alors que l'augmentation de synthèse de la protéine serait encore détectable 24h après (Chamboredon et al., 2011). Nous avons réalisé un essai de marquage immunohistochimique de la protéine Hif-1 α sur un rat contrôle et un rat expérimental testés à J1 et euthanasiés immédiatement après le rappel (figure 42). Ce marquage laisse entrevoir plus de cellules exprimant la protéine Hif-1 α , et ce de façon plus intense au sein du cortex orbitofrontal du rat expérimental (l'intensité du laser et l'épaisseur de coupe imagée n'ayant pas varié d'un rat à l'autre) ; le résultat était similaire au sein du cortex cingulaire antérieur.

Bien sûr, cette observation appelle une étude systématique, soit de l'expression de la protéine par marquage sur coupes de rats euthanasiés 12h à 24h après l'interaction sociale, soit de la quantité d'ARNm par qPCR à un délai bien plus court, de l'ordre d'une heure après l'interaction sociale. Cela suggère néanmoins qu'un signal hypoxique pourrait bien être à l'origine du processus angiogénique.

Nécessité d'une étude invasive

Le paragraphe présentant les liens possibles entre angiogenèse et régulation des épines dendritiques plaide pour une implication fonctionnelle de ce phénomène dans le processus de consolidation mnésique. Pour autant, de par la nature corrélative de notre étude, on ne peut formellement exclure que l'angiogenèse soit simplement un sous-produit du développement des épines dendritiques libérant des facteurs de croissance, et ne présente alors pas de réelle fonctionnalité. Le chapitre suivant vise à déterminer de façon invasive l'implication fonctionnelle de l'angiogenèse précoce (plus particulièrement celle se déroulant au sein des régions corticales). Nous avons cherché à la bloquer afin de déterminer son rôle physiologique, ainsi qu'à la stimuler afin de mettre en évidence une potentielle application thérapeutique. Nos résultats de marquage de cellules endothéliales proliférantes présentés en partie III (ainsi que les données de qPCR évoquées plus haut) obtenus au cours des derniers mois, bien après nos premières expériences invasives, laissent penser que dans le cadre de ce projet le CCA serait la région à cibler préférentiellement. Cependant, dans la suite de cette thèse le COF a été initialement choisi comme région corticale cible, sur la base des travaux d'Edith Lesburguères qui s'était concentrée sur cette structure et en avait clairement montré l'implication fonctionnelle dans le rappel de la mémoire ancienne mais pas de la mémoire récente, ainsi que l'étiquetage neuronal précoce.

Etude invasive : modulation de l'angiogenèse

Implication fonctionnelle de l'angiogenèse
corticale précoce dans le processus de
consolidation mnésique

I. Introduction sur les stratégies de modulation de l'angiogenèse

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence qu'une angiogenèse se produit dès les premiers jours qui suivent l'encodage d'une nouvelle information olfactive associative, et ce même dans les régions corticales qui ne la prendront pourtant en charge que plusieurs semaines plus tard. Dans ce chapitre, nous testons l'implication fonctionnelle de ce phénomène, cherchant à déterminer si bloquer (ou stimuler) l'angiogenèse corticale précoce perturbe (ou améliore) les performances de mémoire ancienne des rats.

De nombreuses drogues ont déjà été développées afin de bloquer l'angiogenèse par « sprouting » au sein des tumeurs et stopper ainsi leur progression, cependant nombre d'entre elles manquent de sélectivité. En effet, de nombreuses molécules impliquées dans l'angiogenèse affectent aussi la guidance axonale, permettant le développement coordonné des réseaux vasculaire et neuronal (Adams and Eichmann, 2010). Nous faisons ici une revue de différentes stratégies que nous avons ensuite testées.

1) Blocage de l'angiogenèse en ciblant le VEGF ou ses récepteurs

La voie de signalisation du VEGF et de ses récepteurs est, comme indiqué dans l'introduction du chapitre précédent, essentielle à la régulation de l'angiogenèse. Cependant, il a été montré que la simple inhibition du VEGF ou de ses récepteurs peut être contournée au sein des tumeurs via de multiples mécanismes. Ainsi, une inhibition prolongée des récepteurs au VEGF conduit à la surexpression d'autres facteurs angiogéniques tels que les FGFs, le PDGF- β , les angiopoïétines et les éphrines (Casanovas et al., 2005 ; Ali et al., 2010 ; voir introduction du chapitre précédent pour leurs rôles dans les différentes phases de l'angiogenèse), ce qui a amené au développement de multi-drogues ciblant la voie de signalisation du VEGF et simultanément une autre voie de signalisation impliquée dans l'angiogenèse. Celles-ci se sont avérées plus efficaces dans le blocage de ce mécanisme et semblent éviter le développement d'une résistance à la drogue (pour revue voir Petrillo et al., 2012).

Au cours de l'angiogenèse, les cellules endothéliales libèrent du PDGF- β , recrutant ainsi les péricytes surexprimant son récepteur PDGFR- β (Hellberg et al., 2010). Les péricytes permettent de stabiliser les nouveaux vaisseaux et assurent la survie des cellules endothéliales par le VEGF qu'ils produisent. Ainsi, le PDGF- β joue un double rôle dans l'angiogenèse : d'une part, il peut promouvoir l'angiogenèse en assurant la production

de concentrations élevées de VEGF par les péricytes (les tumeurs peuvent ainsi contourner l'inhibition du VEGF en surexprimant PDGF- β); d'autre part il contribue à la stabilité des néo-vaisseaux en stimulant leur maturation. Le blocage simultané des récepteurs au PDGF- β et des récepteurs au VEGF constitue le principe de nombreuses drogues anticancéreuses visant à stopper l'angiogenèse tumorale (Petrillo et al., 2012). Nous avons choisi l'une d'elles, le **Vatalanib** (aussi appelé PTK787/ZK222584). Celui-ci cible de façon prédominante les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 IC_{50} =77nmol/L ; VEGFR-2 IC_{50} =37nmol/L ; VEGFR-3 IC_{50} =660nmol/L) et assure aussi l'inhibition des récepteurs au PDGF- β (IC_{50} =580nmol/L) (Wood et al., 2000). Le Vatalanib s'est avéré efficace pour réduire les tumeurs en affectant leur vascularisation chez la souris (Dreves et al., 2000 ; Dreves et al., 2002 ; Wood et al., 2000). Des essais cliniques présentent de plus des résultats prometteurs entre autres pour le traitement des glioblastomes (NCT00128700).

Utiliser le Vatalanib pose un problème de spécificité : en effet, comme beaucoup d'autres acteurs de l'angiogenèse, les récepteurs au VEGF ne sont pas spécifiques des vaisseaux ; ils sont aussi exprimés par les neurones ou encore les astrocytes. Son utilisation par injection intracérébrale est donc compromise. Cela a déjà été tenté par Pati et al. (2009), qui montrent qu'une injection intra-hippocampique de Vatalanib chez le rat immédiatement après l'entraînement dans une piscine de Morris perturbe la mémoire testée 2 jours plus tard, et que cette perturbation est associée à une augmentation de la phosphorylation de ERK, protéine impliquée dans des cascades moléculaires nécessaires à la formation d'une mémoire spatiale à long terme. Nous avons voulu éviter d'injecter directement dans le cerveau de nos rats le Vatalanib, puisqu'il aurait été impossible de déterminer quelle part de l'effet serait due spécifiquement à un impact sur l'angiogenèse. En injectant cette molécule de façon systémique, on ne la retrouvera dans le cerveau que dans le sang ainsi que peut-être autour des sites angiogéniques où la paroi vasculaire devient poreuse (figure 43).

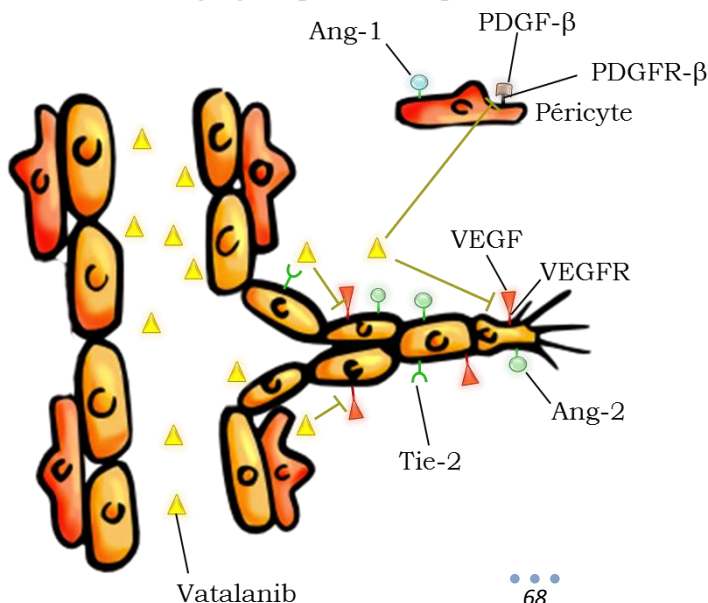


Figure 43 : L'injection systémique de Vatalanib bloque l'angiogenèse en inhibant les récepteurs au VEGF et ceux au PDGF- β .

2) Modulation de l'angiogenèse en ciblant les angiopoïétines Ang-1 et Ang-2

Comme spécifié dans l'introduction du chapitre précédent, cibler l'axe Ang-2/Tie2 présente un avantage de spécificité vasculaire chez l'adulte. Rappelons qu'Ang-2 est impliquée dans la déstabilisation des vaisseaux et donc dans la phase précoce de l'angiogenèse, alors qu'Ang-1 permet le recrutement de péricytes et la maturation des nouveaux vaisseaux qui, s'ils ne se recouvrent pas de péricytes, déclinent. Ainsi, Ang-2 mais aussi Ang-1 sont des cibles potentielles de l'angiogenèse, ce qui explique que plusieurs drogues aient été développées ciblant soit l'interaction Ang-2/Tie2 spécifiquement (L1-7(N) d'Amgen et l'anticorps 3.19.3 de MedImmune), soit simultanément les interactions Ang-2/Tie2 et Ang-1/Tie2 (AMG 386 d'Amgen). Des résultats probants ont été obtenus avec ces 3 drogues (Herbst et al., 2009 ; Coxon et al., 2010 ; Oliner et al., 2004 pour AMG 386 et L1-7(N), Tabruyn et al., 2010 ; Brown et al., 2010 ; Mazzieri et al., 2011 pour 3.19.3) et confirment leur action anti-angiogénique sur les cellules endothéliales, sur le recrutement des péricytes ainsi que sur celui de macrophages exprimant Tie2, connus pour jouer un rôle dans l'angiogenèse tumorale (voir figure 44 et Lewis and Ferrara, 2011 ; De Palma and Naldini, 2011).

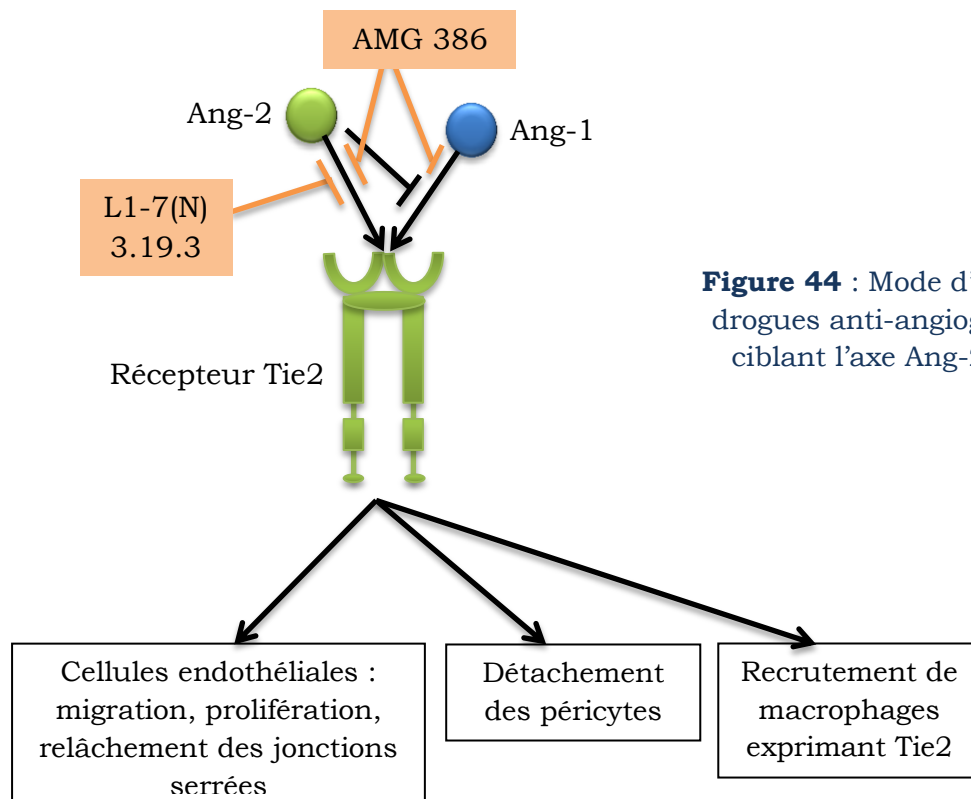


Figure 44 : Mode d'action de drogues anti-angiogéniques ciblant l'axe Ang-2/Tie2.

Cependant, ces médicaments sont pour l'heure en phases d'essais cliniques. Nous avons fait des démarches auprès d'Amgen pour obtenir l'AMG 386 ou le L1-7(N) pour

notre étude ; malheureusement, ceux-ci nous ont finalement été refusés. Les premiers résultats les utilisant nous donnent tout de même un indice majeur : cibler Ang-2 est un moyen efficace de bloquer l'angiogenèse. Nous avons donc souhaité développer des outils permettant de **bloquer la synthèse d'Ang-2** afin d'empêcher l'angiogenèse, ceux-ci sont discutés dans la partie suivante.

Au contraire, pour stimuler l'angiogenèse, l'**injection d'Ang-2 exogène** est une possibilité. Lobov et al. (2002) montrent *in vivo* que l'effet d'Ang-2 dépend de la présence ou non de facteurs de croissance tels que le VEGF ; lorsque ce dernier est présent une injection d'Ang-2 conduit à la dilatation rapide des vaisseaux, au remodelage de la membrane basale, à la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et stimule la formation de nouveaux vaisseaux par « sprouting ». Cependant, à trop fortes concentrations, une injection intracérébrale d'Ang-2 peut conduire à la rupture de la barrière hémato-encéphalique et à l'apoptose de cellules endothéliales en parallèle de phénomènes angiogéniques (Nag et al., 2005). Nous nous sommes basés sur ces deux articles afin de choisir la concentration d'Ang-2 à injecter de façon exogène dans le cerveau de nos rats, pour y stimuler l'angiogenèse sans entraîner les effets indésirables rapportés par Nag et al. (2005).

3) siRNA, shRNA, oligonucléotides antisens, quels outils pour quoi ?

Nous n'avons trouvé que deux travaux utilisant des outils développés afin de cibler l'ARN messager codant pour Ang-2 : Bhandari et al. (2006) utilisent des petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre Ang-2 chez la souris, et Marteau et al. (2011) électroporent chez l'embryon de souris des plasmides codant pour un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) dirigé contre Ang-2.

shRNA, siRNA et oligonucléotides antisens (ONAS) sont des techniques qui se ressemblent et ont toutes la même finalité, la dégradation de l'ARN messager (ARNm) ciblé conduisant à l'extinction du gène visé. L'expression *in vitro* d'un shRNA nécessite son incorporation au sein d'un plasmide, méthode qui n'est pas utilisable *in vivo* sauf cas particuliers (par exemple électroporation chez l'embryon, voir Marteau et al., 2011), on a alors recours à son intégration au sein d'un vecteur viral qui va permettre son entrée dans les cellules *in vivo*. Une fois transcrit, le shRNA est chargé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qu'il dirige vers les ARNm possédant une séquence complémentaire. Ces ARNm ciblés sont alors clivés dans le cas d'une complémentarité parfaite. Ayant un faible taux de dégradation et une bonne stabilité, ces shRNA sont des outils de choix dans l'objectif d'éteindre un gène sur le long terme

(Burnett and Rossi, 2012). Nous avons développé avec Nathalie Dutheil (IMN UMR 5293) des **virus adéno-associés (AAVs) exprimant un shRNA dirigé contre Ang-2**, dont la séquence a été extraite de la construction rat Ang2 shRNA (Origene). Des promoteurs bien précis devant être utilisés afin que le shRNA s'exprime en adoptant bien sa structure en épingle à cheveux, il était impossible de les mettre sous contrôle d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales (par exemple le promoteur de Tie2, couramment utilisé à cette fin). Nous évoquerons dans ce chapitre cette stratégie de blocage de l'angiogenèse, cependant nos premiers résultats concernant l'impact d'AAVs exprimant un shRNA anti-Ang2 sur les performances dans la tâche de TSPA seront obtenus au moment où cet écrit de thèse sera rendu.

L'avantage des siRNA et ONAS pour ce projet est que ces stratégies induisent l'extinction d'un gène sur une courte période, permettant de ne cibler que la phase initiale du processus de consolidation mnésique, ces composés pouvant être injectés directement sans recourir à un vecteur viral ; le désavantage est que cela nécessite des injections répétées et donc plus traumatiques sur des périodes voisines de l'encodage de l'information. De plus, ces composés présentent une toxicité qui dépend des doses utilisées ainsi que des modifications chimiques apportées à la séquence de base afin de faciliter la transfection dans les cellules. Dans le cas des ONAS, l'ARN cible est dégradé par la RNase H, et dans le cas des siRNA par le complexe RISC (pour revue voir Kole et al., 2012). Nous avons choisi d'utiliser des **ONAS dirigés contre Ang-2** plutôt que des siRNA, ce type d'outil moléculaire basé sur de l'ADN protégé présentant une meilleure stabilité que les ARN. Par ailleurs, des ONAS ont déjà été utilisés au sein de l'équipe dans le but d'éteindre des gènes dans des cellules vasculaires. Nous avons donc un meilleur recul sur leur utilisation.

4) Vue d'ensemble sur le chapitre

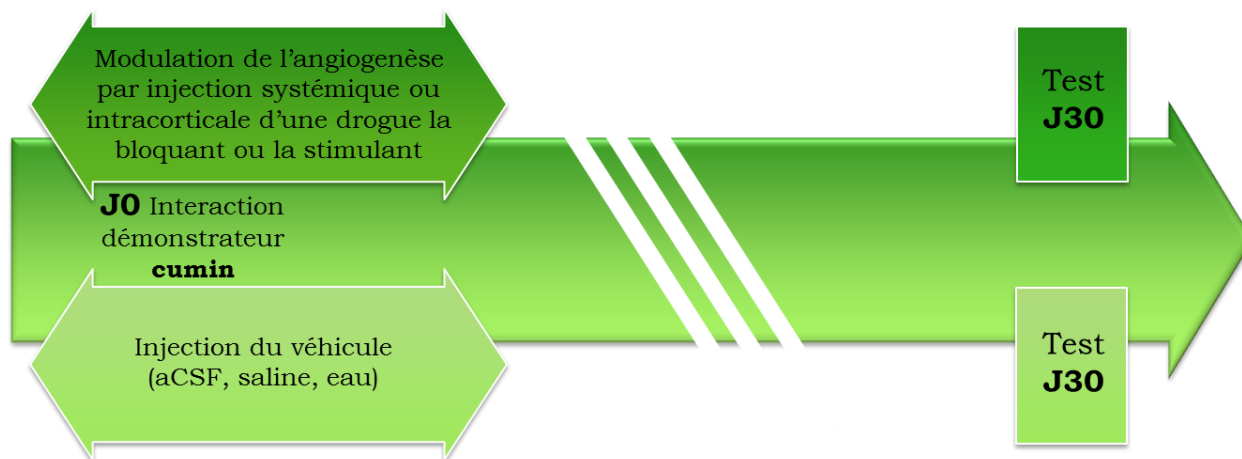


Figure 45 : Protocole expérimental général.

Les protocoles expérimentaux de toutes les expériences considérées dans ce chapitre suivent la même logique (figure 45). L'idée est, à chaque fois, d'utiliser deux groupes de rats qui vont former une nouvelle mémoire olfactive associative lors de l'interaction sociale avec un démonstrateur ayant mangé du cumin. Chez l'un de ces groupes, on bloque (ou stimule) l'angiogenèse corticale en début du processus de consolidation mnésique, en faisant l'hypothèse que cela devrait perturber (ou améliorer) les performances de mémoire ancienne testée à J30 par rapport à l'autre groupe de rats recevant seulement le véhicule. Les techniques, doses, timings d'injection seront à chaque fois détaillés avant l'expérience correspondante.

Seront exposés dans ce chapitre les résultats concernant :

- *des stratégies de blocage de l'angiogenèse essentiellement systémiques utilisant le Vatalanib ;*
- *des stratégies de blocage de l'angiogenèse utilisant les ONAS dirigés contre Ang-2 ;*
- *une stratégie de stimulation de l'angiogenèse par injection intracorticale d'Ang-2 exogène.*

Nous avons aussi pensé à une autre stratégie de blocage de l'angiogenèse utilisant un inhibiteur mitotique (tel qu'Ara-C) induisant le blocage de la prolifération cellulaire. Cependant, les marquages de cellules proliférantes présentés en fin du chapitre précédent laisse planer un doute sur la nature de certaines d'entre elles, situées dans des zones peuplées de neurones et ne semblant pas appartenir au réseau vasculaire. Ainsi, il se pourrait que les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur soient aussi le théâtre d'une neurogenèse qui, même si elle est minime, nous empêche d'utiliser Ara-C dont l'effet pourrait être en partie neuronal ou glial (voir aussi Fan et al., 2014).

Le temps nécessaire au développement de ces différentes stratégies (en particulier ONAS et AAVs exprimant un shRNA, tous deux dirigés contre Ang-2) explique que nous ayons avancé l'approche invasive avant d'obtenir des arguments complets et solides (BrdU, qPCR) concernant l'angiogenèse se déroulant au début du processus de consolidation mnésique.

II. Blocage systémique de l'angiogenèse précoce par injection de Vatalanib

1) Injections intrapéritonéales à 50mg/kg

La dose de Vatalanib généralement utilisée (voir références données en introduction) est de 50mg/kg par voie orale. Cette première expérience consiste à injecter cette même dose par voie intrapéritonéale la veille et le jour même de l'interaction sociale (1h30 avant), et d'évaluer la mémoire récente des rats à J1 (figure 46).

Injections intrapéritonéales (i.p.) de
Vatalanib (50mg/kg) ou saline

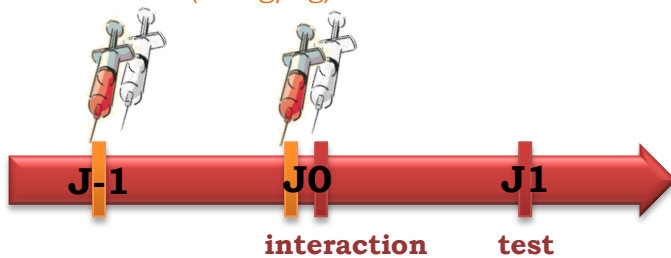


Figure 46 : Protocole expérimental.

Les résultats sont présentés sur la figure 47.

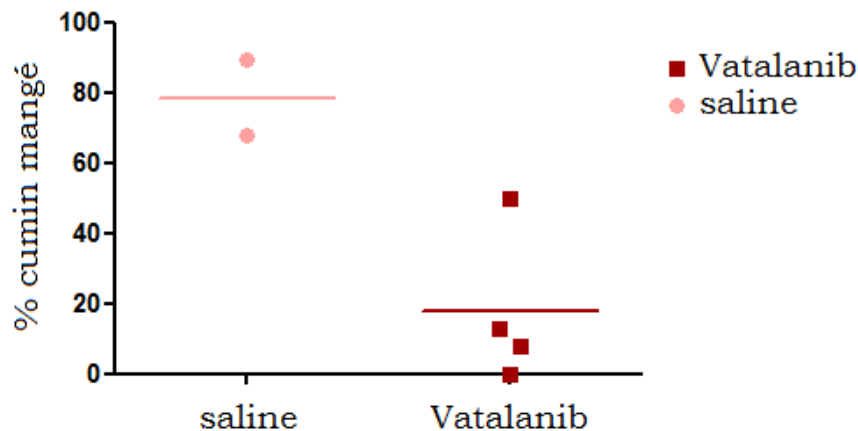


Figure 47 : Résultats du test de TSPA à J1 après 2 injections i.p. de Vatalanib à 50mg/kg. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention (choix entre de la nourriture aromatisée au thym ou au cumin) par les rats témoins (saline) et ceux traités au Vatalanib. n=2-4 rats par groupe.

Les quelques rats traités semblent avoir totalement oublié l'information dès le jour qui suit l'interaction. Effet anti-angiogénique du Vatalanib ou simples effets secondaires ? Nous avons en effet noté une légère ataxie suite à l'injection de Vatalanib, de plus les rats traités restaient prostrés dans la cage sans bouger plus d'une heure après la seconde injection. Nous avons vérifié que les rats interagissaient tout de même en comptant le nombre de contacts nez-nez au cours d'une interaction avant que la grille

ne soit enlevée, et leur nombre était quasiment identique chez un rat traité au Vatalanib (15 contacts) et chez un rat témoin ayant reçu de la solution saline (14 contacts). Une fois la grille enlevée, le comportement de ces 2 rats était similaire : ils se sont initialement battus avec le démonstrateur, puis ont passé le restant de l'interaction à se renifler. Toutefois, même si les interactions semblent s'être passées de façon habituelle, les rats traités au Vatalanib n'étaient pas dans leur état normal à J0. Il est possible qu'ils aient mal encodé l'information transmise lors de l'interaction sociale simplement car la drogue les a rendus malades. Il semble d'ailleurs que lors du test à J1, ces derniers manquent d'appétit (au total 4,3g de nourriture consommée durant les 20mn de test contre 6,5g pour les rats ayant reçu une injection de saline).

Pour cette raison, nous n'avons pas poursuivi les expériences avec ce protocole, avons descendu la dose à 25mg/kg et réduit le nombre d'injections.

2) Injection intrapéritonéale à 25mg/kg

Le nouveau protocole est le suivant (figure 48):

Injection i.p. de
Vatalanib (25mg/kg) ou saline



Figure 48 : Protocole expérimental.

Les rats sont injectés 1h30 avant l'interaction, à J0 seulement, avec une solution saline ou une solution de Vatalanib à 25mg/kg. Ils sont testés soit à J1 soit à J30, dans l'hypothèse que le blocage systémique de l'angiogenèse puisse perturber la mémoire ancienne et pas, ou moins, la mémoire récente. Cette fois-ci, les rats n'ont pas présenté de signe extérieur de mal-être ni de perte d'appétit suite à l'injection de Vatalanib.

Les résultats sont présentés sur la figure 49. Les rats traités au Vatalanib obtiennent de bonnes performances mnésiques à J1 mais, contre nos attentes, c'est aussi le cas à J30. Le Vatalanib injecté suivant ce protocole semble n'avoir aucun effet sur les performances mnésiques des rats (effet groupe $F(1,14)=1,32$; $p=0,270$; NS). Craignant qu'une seule injection de Vatalanib soit insuffisante et que l'angiogenèse se remette en place les jours qui suivent chez les rats traités au Vatalanib, nous avons ensuite testé

un protocole avec injections répétées à la même dose de 25mg/kg, que les rats semblent bien tolérer.

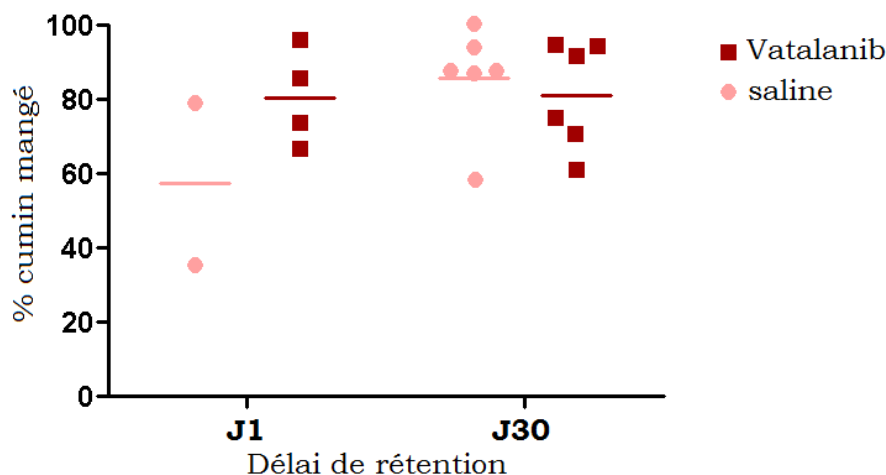


Figure 49 : Résultats du test de TSPA à J30 après une injection i.p. de Vatalanib à 25mg/kg. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention par les rats témoins (saline) et ceux traités au Vatalanib. n=2-6 rats par groupe.

3) Injections intrapéritonéales répétées à 25mg/kg

Le nouveau protocole est le suivant (figure 50):

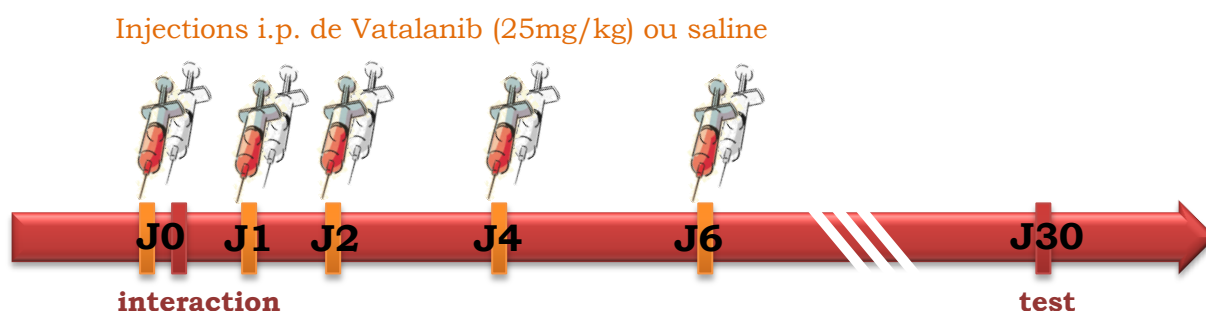


Figure 50 : Protocole expérimental.

Les rats sont injectés 1h30 avant l'interaction à J0, puis à J1, J2, J4 et enfin J6, afin de couvrir une plus longue période. Aucun signe extérieur de mal-être des rats traités au Vatalanib n'a été noté.

Les résultats du test à J30 sont présentés en figure 51 en page suivante. Dans cette expérience, les quelques rats du groupe témoin (saline) ont obtenu des performances comportementales plus basses que d'habitude (32,8% en moyenne contre 60 à 80% en moyenne chez des rats non injectés), sans raison apparente. Cela peut être dû à différents facteurs, que l'on ne peut contrôler (le rat se souvient très bien que le cumin est sans danger mais a une telle préférence pour le thym qu'il mange tout de même plus de cette nourriture pourtant inconnue) ou que l'on pourrait contrôler (l'interaction s'est

mal déroulée, l'observateur et le démonstrateur ont peu interagi). Nous avons développé en 2014 avec Benjamin Bessières, doctorant de l'équipe, un protocole permettant le video-tracking et le suivi de différents paramètres (nombre de contacts, durée totale d'interaction entre observateurs et démonstrateurs) lors de l'interaction sociale, dans le but de s'assurer que les observateurs reçoivent la même quantité d'information. Nous n'avons pas eu recours au contrôle de l'interaction au cours de cette thèse, les avantages qu'il procurerait seront développés dans la discussion générale.

Les rats traités au Vatalanib obtiennent de bons scores à J30 (66,5% en moyenne), laissant douter qu'un tel protocole puisse les perturber. Nous n'avons donc pas répliqué cette expérience, et sommes passés à des injections *per os* (administration orale à l'aide de sondes de gavage) en suivant le protocole exact décrit dans les références citées en introduction (administration orale à 50mg/kg une fois tous les jours).

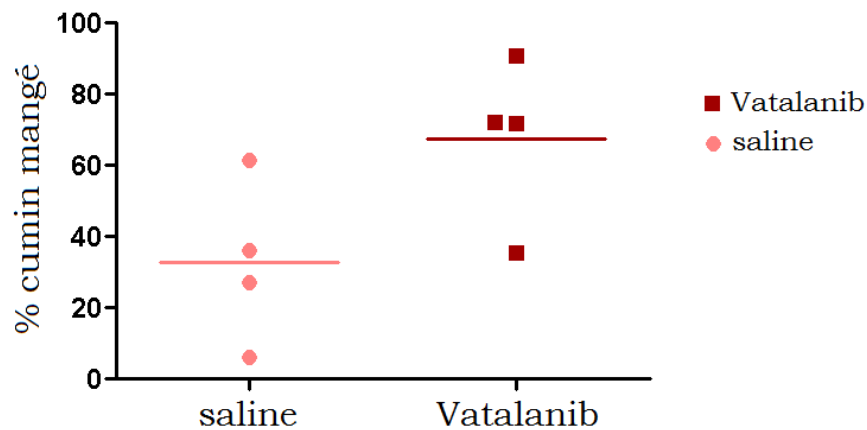


Figure 51 : Résultats du test de TSPA   J30 après 5 injections i.p. de Vatalanib à 25mg/kg. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention par les rats témoins (saline) et ceux traités au Vatalanib. n=4 rats par groupe.

4) Injections *per os* répétées à 50mg/kg

Le nouveau protocole est le suivant (figure 52):

Injections *per os* de Vatalanib (50mg/kg) ou d'eau

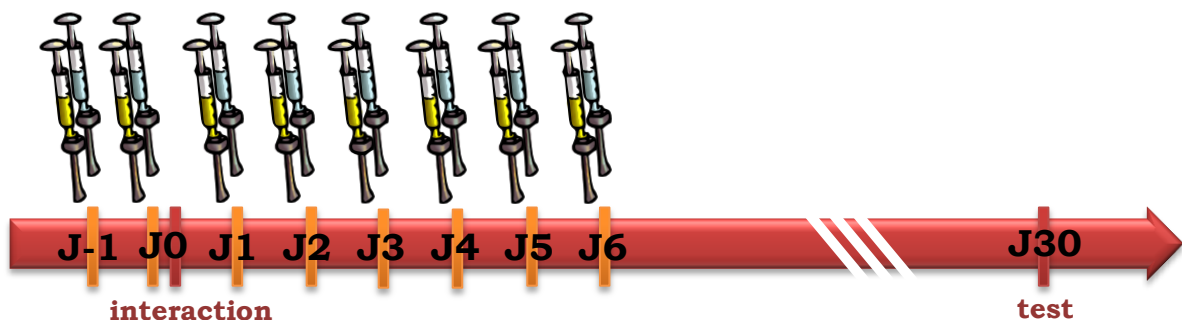


Figure 52 : Protocole expérimental.

Les rats sont injectés *per os* tous les jours de J-1 à J6 avec de l'eau ou une solution de Vatalanib à 50mg/kg. Nous reprenons ainsi le protocole classiquement utilisé dans la littérature, en couvrant la période de début de processus de consolidation mnésique. Lors de l'absorption digestive qui suit l'administration orale, la drogue peut rencontrer au niveau de la muqueuse intestinale ou du foie des enzymes susceptibles de la transformer en métabolites actifs ou non, ce qui explique que les effets d'une drogue puissent différer lorsqu'elle est injectée par voie intrapéritonéale ou orale. De plus, la dose administrée est ici plus grande que lors des essais d'injections i.p., une partie du Vatalanib étant susceptible d'être métabolisée avant d'arriver dans le sang. Cette dose n'a pas eu de conséquence néfaste visible sur l'état des rats. Les résultats du test mnésique à J30 sont présentés sur la figure 53 ci-dessous.

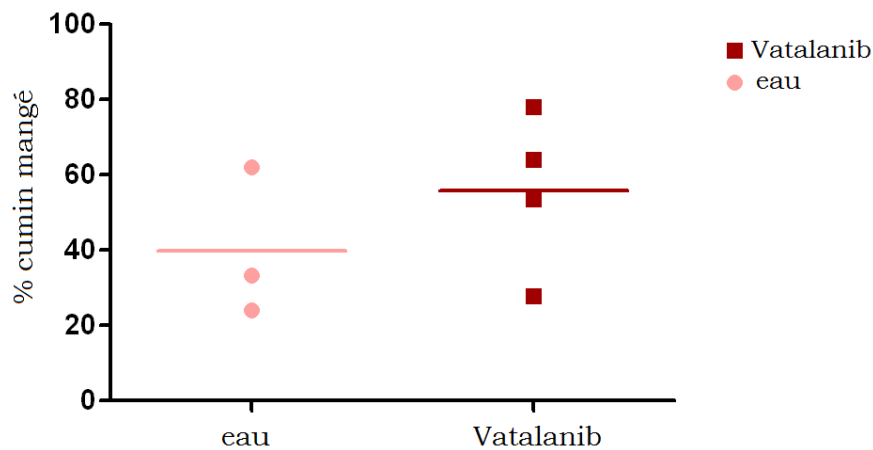


Figure 53 : Résultats du test de TSPA à J30 après 8 injections *per os* de Vatalanib à 50mg/kg. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention par les rats témoins (eau) et ceux traités au Vatalanib. n=3-4 rats par groupe.

Ici encore, les rats traités au Vatalanib ne semblent pas perturbés, réalisant des performances correctes au test mnésique réalisé à J30 (55,8% en moyenne) et même meilleures que les témoins (39,8% en moyenne) qui n'étaient à nouveau pas très bons dans ce groupe. Nous n'avons pas non plus répliqué cette expérience suite à ces premiers résultats peu encourageants pour une stratégie d'inhibition.

5) Injections intracérébrales

Après avoir cherché à optimiser au mieux le protocole d'injection systémique de Vatalanib, suite à cette série de résultats négatifs, nous avons testé des injections visant directement le cortex orbitofrontal. Il s'agit de la région qu'Edith Lesburguères, anciennement doctorante dans l'équipe, avait choisie pour cible afin de montrer l'existence de l'étiquetage neuronal précoce et la possibilité d'impacter positivement ou

négativement sur les performances de mémoire ancienne en modulant ce phénomène (Lesburguères et al., 2011).

Ce protocole (figure 54) présente le désavantage souligné dans l'introduction de pouvoir difficilement déterminer la part vasculaire de la part neuronale (ou autre) d'un effet de la drogue. Néanmoins, avec un tel protocole nous espérons mettre en évidence une perturbation de la mémoire ancienne chez les rats ayant reçu du Vatalanib intracortical. La dose a été choisie en référence à l'article de Pati et al. (2009), qui montre qu'une injection intra-hippocampique de Vatalanib à une concentration de 2ng/ μ L immédiatement après entraînement dans une piscine de Morris perturbe la mémoire testée 2 jours plus tard.

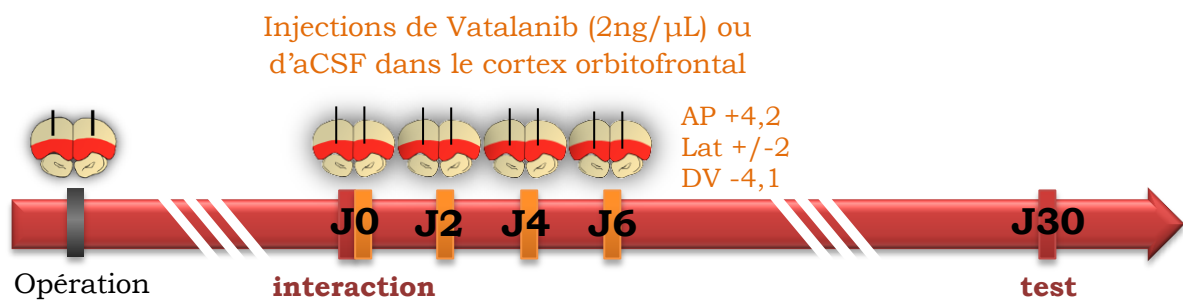


Figure 54 : Protocole expérimental.

Un mois après l'implantation de guides canules aux rats, nous avons injecté 1 μ L de solution contenant 2ng de Vatalanib en bilatéral dans le cortex orbitofrontal des rats immédiatement après l'interaction sociale à J0, puis à J2, J4 et enfin J6. Les rats témoins reçoivent aux mêmes moments du fluide cérébrospinal artificiel (aCSF). Les résultats sont présentés sur la figure 55.

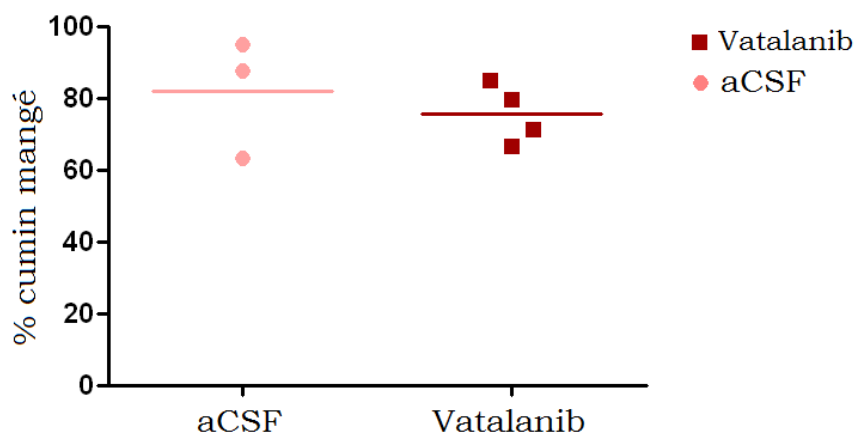


Figure 55 : Résultats du test de TSPA à J30 des rats ayant reçus 4 injections intracérébrales de Vatalanib à 2ng/ μ L. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention par les rats témoins (aCSF) et ceux traités au Vatalanib.
n=3-4 rats par groupe.

Dans cette expérience, les deux groupes de rats ont obtenu un excellent score pour un test réalisé à J30 (en moyenne 82% pour les témoins versus 76% pour les rats traités au Vatalanib). Les rats traités au Vatalanib ne sont ici encore pas perturbés (test de Mann-Whitney $p=0,63$; NS), nous n'avons donc pas répliqué l'expérience.

6) Conclusion

Nos différents protocoles d'injection systémique de Vatalanib en début de consolidation mnésique ne révèlent aucune perturbation de la mémoire ancienne des rats testés à J30. Il en est de même pour notre protocole d'injection intracérébrale. Ces résultats négatifs seront discutés en fin de chapitre.

Nous n'avons pas poussé plus loin les expériences reposant sur le Vatalanib, au vu de ces différents résultats préliminaires. De plus, cette drogue n'étant pas spécifique des vaisseaux sanguins, tout résultat avec elle serait difficilement interprétable. Nous avons alors développé des outils permettant de cibler spécifiquement le compartiment vasculaire, présentés dans la partie suivante : ONAS anti-Ang-2 et AAVs exprimant un shRNA anti-Ang-2.

III. Blocage de l'angiogenèse corticale précoce par injection d'ONAS dirigés contre Ang-2

1) Essais d'injections intraveineuses

Comme nous l'avons déjà souligné, Ang-2 est considérée comme étant spécifiquement produite par les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. Pourtant, les fibroblastes (Lee et al., 2006) et les astrocytes des glioblastomes avancés (Audero et al., 2001) pourraient aussi exprimer Ang-2. Pour avoir le protocole le plus « propre » possible ciblant spécifiquement le compartiment vasculaire, nous avons envisagé d'injecter les ONAS au sein de la circulation sanguine, en présence d'un produit de transfection (*in vivo*-jetPEI, voir matériels et méthodes pour les détails) afin de leur permettre une meilleure intégration au sein des cellules endothéliales (qui ont des chances d'être les seules à l'intégrer). Nos premiers essais portent sur une injection caudale (figure 56).

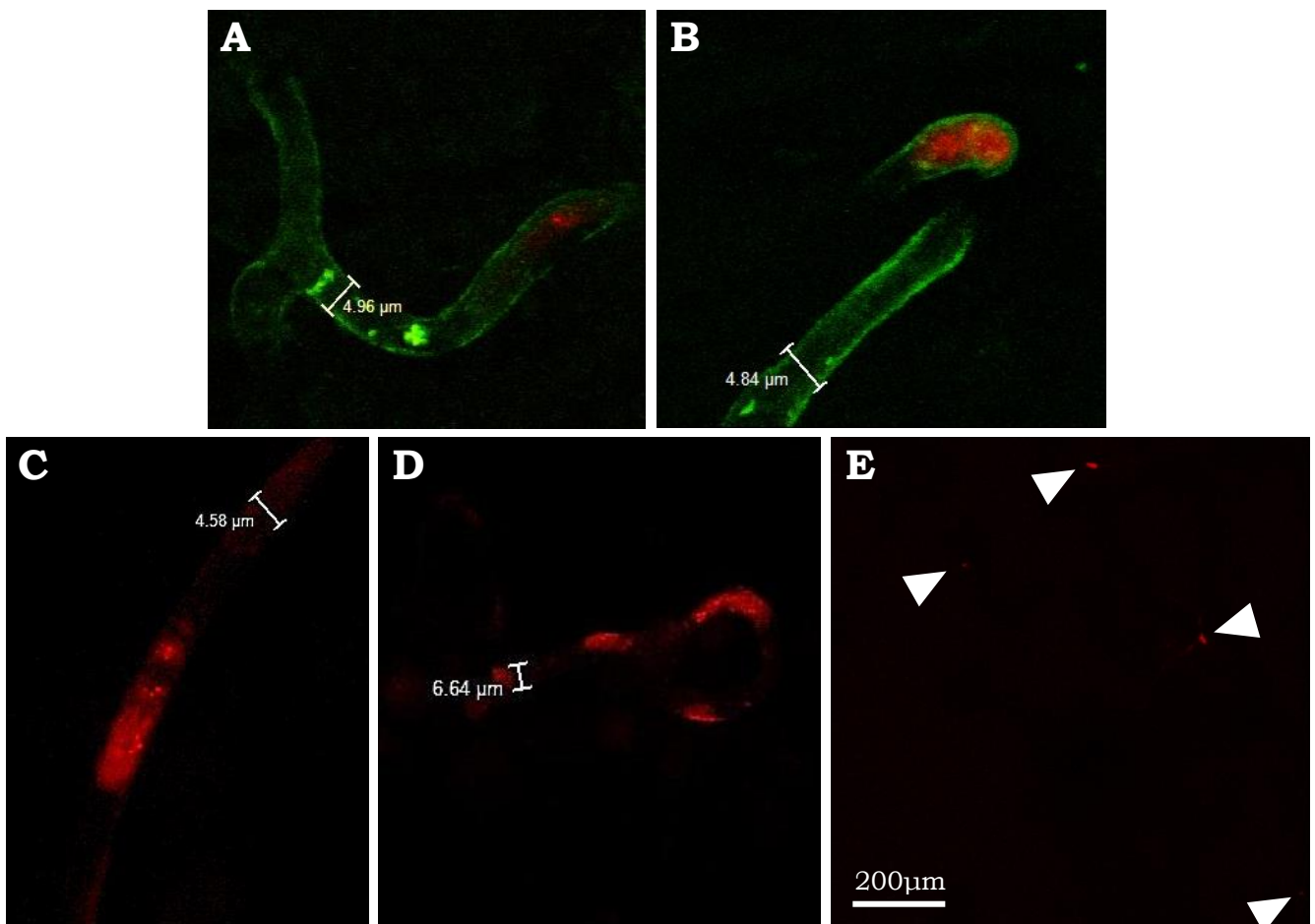


Figure 56 : ONAS taggés avec Cy3 (fluorophore rouge et flèches blanches sur **(E)**) au sein de vaisseaux sanguins marqués en vert (Lectine-FITC) sur **(A)** et **(B)**. Les rats ont été perfusés 24h après injection dans une veine caudale de **(A),(B)** 200μg d'ONAS et **(C),(D),(E)** 450μg d'ONAS.

Les images présentées sur la figure 56 ont été prises au sein des régions corticales d'intérêt. On remarque la présence d'ONAS au sein de quelques cellules endothéliales suite à une injection caudale de 200µg de ceux-ci (figures 56A et 56B) ; en augmentant la dose à 450µg on en retrouve visiblement le long de certains vaisseaux, il ne s'agit plus seulement de cellules isolées (figures 56C et 56D). Cependant, les zones ayant intégré des ONAS restent éparées (figure 56E, vue d'ensemble dans le cortex cingulaire antérieur), ce qui est certainement insuffisant pour bloquer efficacement l'angiogenèse, alors que nous sommes au seuil à ne pas dépasser pour éviter d'induire une toxicité liée aux ONAS (selon le protocole fourni par Polyplus pour l'utilisation de son agent de transfection). Sur leurs conseils, nous avons pensé essayer des injections rétro-orbitaires (Yardeni et al., 2011), mais le protocole est délicat chez le rat et les injections répétées fortement déconseillées.

Nous avons enfin réalisé des injections d'ONAS dans la circulation sanguine via la carotide ou la jugulaire avec l'aide de Caroline Vouillac (IMN UMR 5293) pour l'implantation du cathéter. Les rats dont la carotide était cathétérisée sont morts sous 3 jours (d'habitude les animaux ne sont pas gardés pour du comportement après une telle opération), les rats dont la jugulaire était cathétérisée ont bien résisté à l'opération mais la distribution des ONAS dans les vaisseaux cérébraux n'était pas meilleure que celle obtenue après injection caudale. De ce fait, nous avons finalement opté pour des injections intracérébrales d'ONAS, les injections dans la circulation sanguine ne permettant pas une intégration suffisamment importante des oligonucléotides au sein des cellules endothéliales cérébrales.

2) Injection d'ONAS à 6µg/µL dans le cortex orbitofrontal

Nous basant sur des publications relatant les résultats d'injections intracérébrales d'ONAS à une concentration de l'ordre de 2µg/µL 2 fois par jour pendant 2 jours (Neumann, 2000), 6µg/µL ponctuellement (Lee et al., 2004) ou 10µg/µL chaque jour pendant 14 jours (Boye et al., 2002), nous avons choisi une concentration de 6µg/µL pour des injections répétées suivant le protocole ci-dessous (figure 57).

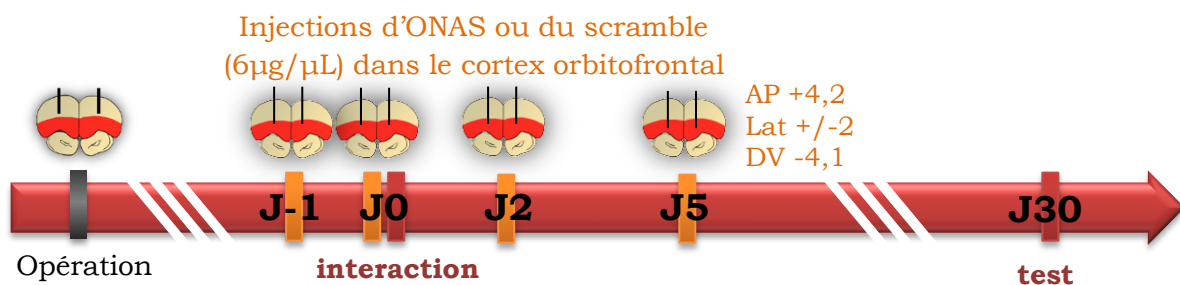


Figure 57 : Protocole expérimental.

Les ONAS ou le scramble (mêmes oligonucléotides que les ONAS mais dans un ordre différent, donnant une séquence ne se fixant à aucun ARNm connu chez le rat) sont injectés la veille de l'interaction, puis le jour même 2h avant l'interaction, ensuite à J2 et enfin à J5.

Il a été montré que la demi-vie de l'ARNm codant pour Ang-2 est de l'ordre de 3h en conditions normoxiques et de l'ordre de 5h en conditions hypoxiques, la protéine étant détectée jusqu'à 24h après stimulation hypoxique au sein de différents types cellulaires (Pichiule et al., 2004). De plus, lorsqu'elle est stockée dans les corps de Weibel-Palade, la demi-vie de la protéine Ang-2 est de l'ordre de 18h (Fiedler et al., 2004). Pour ces raisons, la première injection se fait à J-1, afin de limiter au maximum la présence d'ARNm et de protéine Ang-2 à J0. Les résultats sont présentés en figure 58.

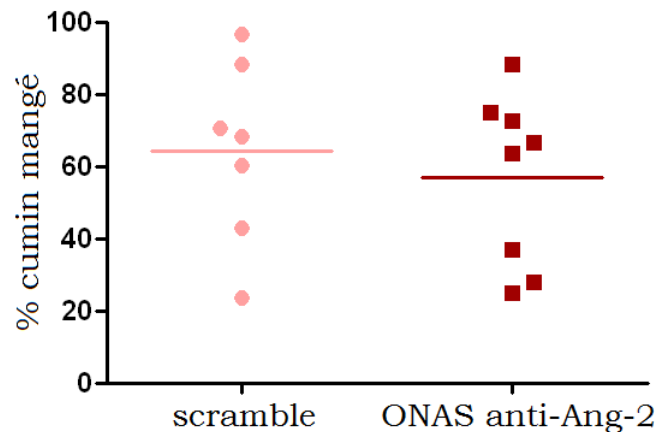


Figure 58 : Résultats de la tâche de TSPA. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention à J30 par les rats témoins (scramble) et ceux ayant reçu les ONAS anti-Ang-2. n=7-8 rats par groupe.

Les performances mnésiques des rats traités avec les ONAS sont similaires à celles des rats traités avec le scramble (en moyenne 57,1% pour le groupe ONAS et 64,4% pour le groupe scramble / t-test non apparié $p=0,57$; NS). Cependant, en prélevant les cerveaux des rats perfusés à 30 jours, nous avons remarqué que la région proche du site d'injection scramble ou ONAS semblait fortement endommagée. Avec un tel traitement, les coupes de cerveau sont détruites sur la majeure partie du cortex orbitofrontal (figures 59A et 59B), aussi bien après injection d'ONAS que de scramble. Sur des coupes intègres car plus distantes du site d'injection, des oligonucléotides sont détectables au sein de vaisseaux sanguins dans certaines zones en-dehors du cortex orbitofrontal (figure 59C). Ainsi, les oligonucléotides ont diffusé trop loin et détruit la région cérébrale cible. Comment se fait-il que ces rats scramble et ONAS aient réalisé des performances mnésiques à J30 correctes, alors que leur cortex orbitofrontal semble quasiment entièrement détruit ?

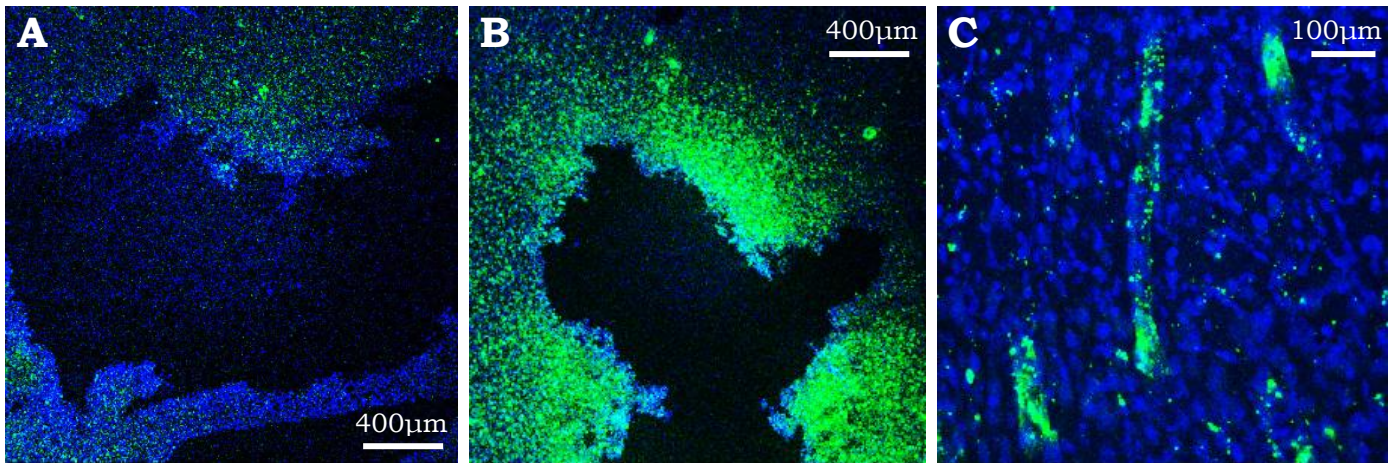


Figure 59 : Coupes de rats ayant reçu des injections d'ONAS ou scramble ($6\mu\text{g}/\mu\text{L}$) taggés avec un fluorophore FAM (en vert). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide de Dapi (en bleu). **(A), (B)** : Vue d'ensemble du cortex orbitofrontal, zone dégradée avec accumulation d'oligonucléotides autour du site d'injection. **(C)** Vaisseaux distants du cortex orbitofrontal ayant intégré des oligonucléotides.

L'inactivation transitoire du cortex orbitofrontal avec du CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, antagoniste des récepteurs AMPA) de J0 à J12 ou de J15 à J27 perturbe pourtant de façon très nette le rappel de mémoire ancienne à J30 (Lesburguères et al., 2011). Les données des travaux de Benjamin Bessières, actuellement doctorant dans l'équipe, confirment de plus son implication dans le rappel de la mémoire ancienne : son inactivation à l'aide de CNQX juste avant le rappel perturbe les rats dont la performance mnésique est alors proche du hasard. Il semble donc que dans notre cas, des phénomènes de compensation fonctionnelle se soient mis en place afin de palier à la dégradation de cette région cérébrale. Cela montre l'importance de choisir une concentration d'ONAS/scramble qui n'induit pas de dégradation de la région cible et idéalement ne diffuse pas hors de celle-ci, tout en étant assez élevée pour que les oligonucléotides intègrent bien les cellules endothéliales.

3) Détermination de la concentration d'oligonucléotides à injecter

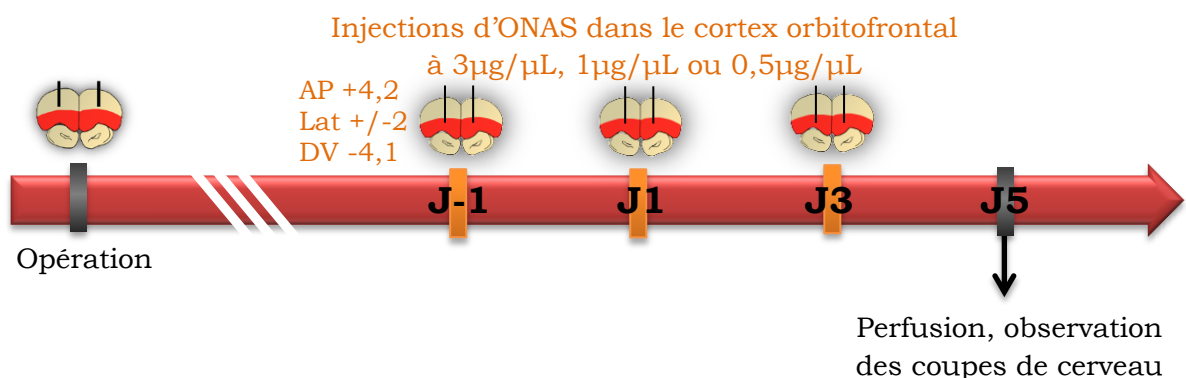


Figure 60 : Protocole expérimental. $n=2$ rats par condition.

Nous avons choisi d'espacer le délai entre 2 injections d'au moins 48h, pour éviter l'accumulation d'oligonucléotides au sein des cellules, facteur de toxicité, et d'injecter à l'avenir à J-1, J1 et enfin J3. L'expérience décrite ici (figure 60) vise simplement à déterminer la concentration d'oligonucléotides la plus élevée qui n'induit pas de dégradation visible du cortex orbitofrontal, avant d'appliquer ce protocole dans le cadre du test de TSPA.

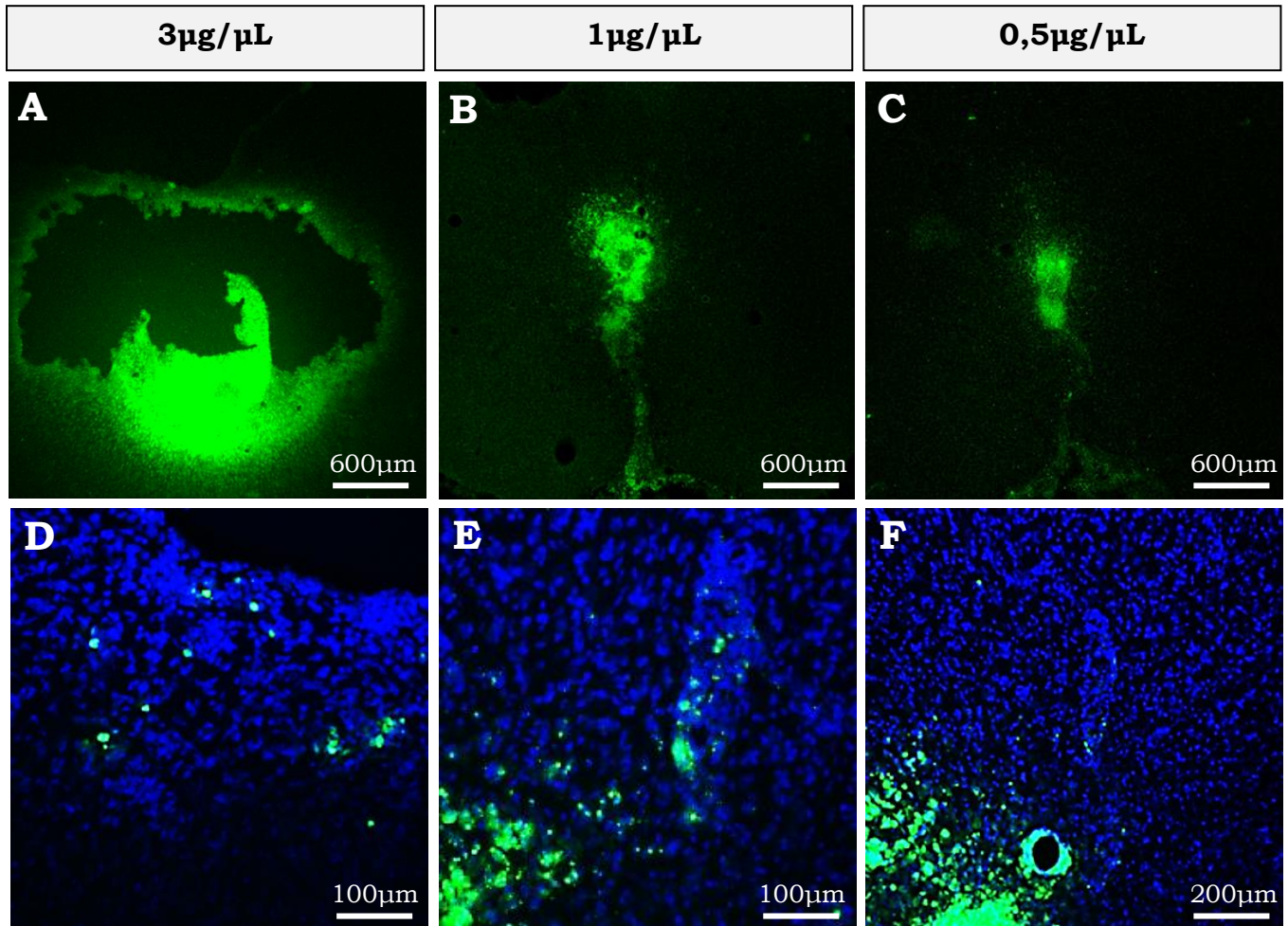


Figure 61 : Coupes de rats ayant reçu des injections d'ONAS taggés avec un fluorophore FAM (en vert). Les noyaux cellulaires sont marqués à l'aide de Dapi (en bleu). Vue d'ensemble du cortex orbitofrontal après les 3 injections d'ONAS à **(A)** 3µg/µL, **(B)** 1µg/µL ou **(C)** 0,5µg/µL. **(D)** Après injection à 3µg/µL, des oligonucléotides sont détectés au sein du bulbe olfactif. **(E)** ONAS ayant pénétré des vaisseaux dans le site où ils ont été injectés à 1µg/µL, **(F)** ONAS ayant pénétré des vaisseaux dans le site où ils ont été injectés à 0,5µg/µL.

Suite à une injection à 3µg/µL (figure 61A), le cortex orbitofrontal est à nouveau détérioré, de plus les ONAS diffusent en-dehors de la zone ciblée (figure 61D). A 1µg/µL, les dégâts sont très limités (figure 61B), les ONAS diffusent mais pas en-dehors du cortex orbitofrontal, et présentent une bonne expression vasculaire (figure 61E).

Enfin, à 0,5µg/µL, les ONAS diffusent très peu, simplement le long de la trace de la canule (figure 61C) et à proximité immédiate du site d'injection (figure 61F).

4) Conclusion

Les résultats de l'expérience présentée en III.2 semblent refléter un phénomène de compensation fonctionnelle mis en place afin de palier à la détérioration du cortex orbitofrontal due à la toxicité des oligonucléotides (ONAS et scramble) injectés de façon répétée à 6µg/µL. Cette toxicité persiste pour 3 injections à 3µg/µL.

L'injection des oligonucléotides à J-1, J1 et J3 à la concentration de 1µg/µL apparaît comme un bon compromis, évitant la détérioration de la région ciblée mais permettant une bonne diffusion dans la région injectée et une bonne expression vasculaire. Ce protocole sera testé d'ici la soutenance de thèse (en ciblant cette fois le cortex cingulaire antérieur, au vu de nos résultats récents de marquages BrdU).

5) Expérience complémentaire : injection des AAVs codant pour un shRNA anti-Ang-2

En complément de ces expériences et comme indiqué dans l'introduction, nous avons développé avec Nathalie Dutheil (IMN UMR 5293) des virus adéno-associés (AAVs) exprimant un shRNA dirigé contre Ang-2 ainsi que la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) permettant de révéler leur distribution au sein de la région cible. La figure 62 montre l'expression de la protéine GFP 15 jours après injection des virus et révèle une bonne diffusion des AAVs et leur intégration au sein de vaisseaux sanguins *in vivo*.

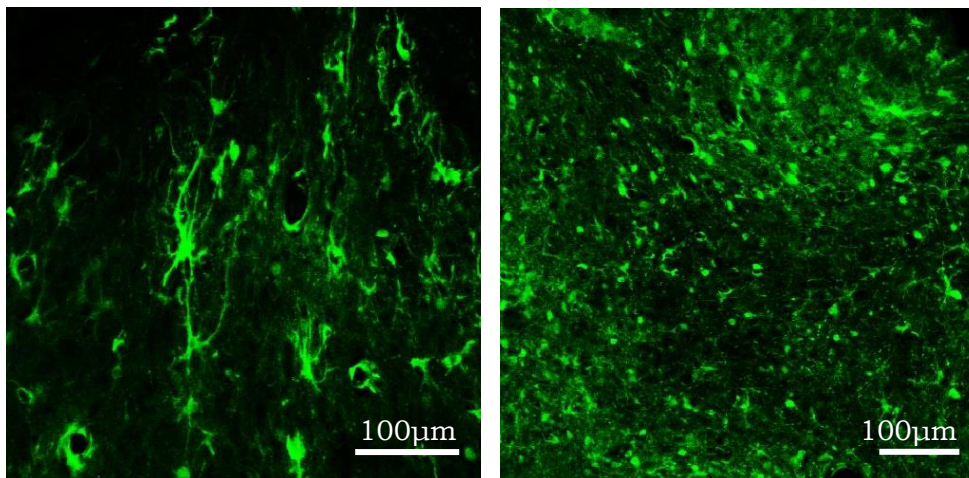


Figure 62 : Marquage révélant l'expression de la protéine GFP (en vert) et ainsi la diffusion et l'intégration au sein du cortex orbitofrontal des AAV-shRNAAng2-GFP, injectés 15 jours auparavant dans cette région (1µL en bilatéral de solution titrée à $4,2 \cdot 10^{12}$ gcp/mL).

Le protocole ci-dessous (figure 63) sera suivi afin de déterminer l'impact de l'expression corticale de shRNA anti-Ang-2 sur la mémoire ancienne des rats testés à J30.

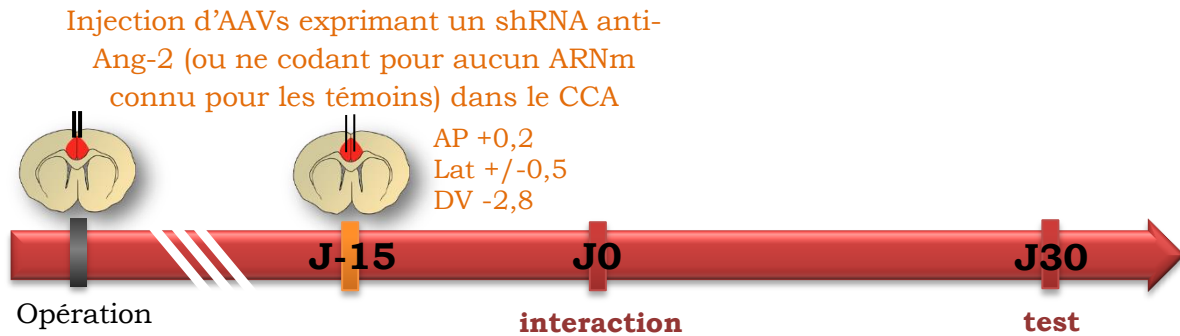


Figure 63 : Protocole expérimental.

Avec cet outil moléculaire, il sera impossible de cibler uniquement le début du processus de consolidation mnésique, alors que l'utilisation des ONAS le permettait. En revanche, l'utilisation d'AAVs présente l'avantage que seule une injection sera réalisée 15 jours avant l'interaction sociale, évitant ainsi les manipulations répétées des rats et les éventuels dommages et inflammations induits dans la région cérébrale ciblée durant la période critique d'acquisition et de post-acquisition de la nouvelle mémoire olfactive associative.

Nous appuyant sur nos résultats récents de marquages BrdU (voir chapitre précédent), nous ciblerons préférentiellement le cortex cingulaire antérieur dans cette expérience dont nous aurons prochainement les résultats préliminaires.

IV. Stimulation de l'angiogenèse corticale précoce par injection d'Ang-2 exogène

1) Protocole expérimental

Le protocole utilisé est détaillé sur la figure 64. Les rats interagissent tous avec un démonstrateur ayant mangé du cumin. La concentration d'Ang-2 (100ng/ μ L) a été déterminée en se basant sur les publications citées en introduction, afin de stimuler l'angiogenèse (Lobov et al., 2002) sans entraîner les effets indésirables rapportés par Nag et al. (2005). Celle-ci est injectée en bilatéral dans le cortex orbitofrontal immédiatement après l'interaction, puis à J2, à J4 et enfin à J6. Aux mêmes moments, le groupe témoin reçoit une injection d'aCSF.

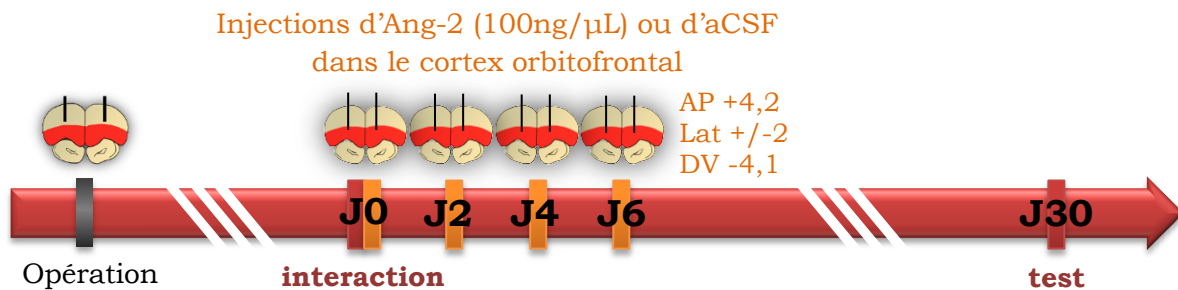
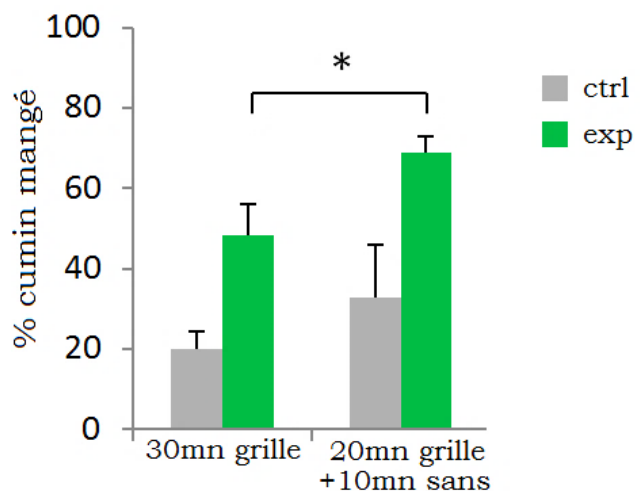


Figure 64 : Protocole expérimental.

Après une interaction au déroulé habituel (20mn avec une grille séparant le démonstrateur de l'observateur, leur permettant d'interagir au travers de trous, suivies de 10mn sans grille au cours desquelles les rats sont libres d'interagir physiquement), les performances mnésiques des rats testés à J1 ou à J30 sont généralement bonnes, laissant planer un doute quant à la possibilité de les améliorer. Afin d'affaiblir la trace mnésique, nous avons utilisé dans cette partie la même astuce que Lesburguères et al. (2011) : en laissant la grille tout au long de l'interaction, la performance mnésique des rats testés à J30 est moins bonne (figure 65). On peut alors espérer l'améliorer.

Figure 65 : Résultats de la tâche de TSPA. Pourcentage de cumin mangé lors du test de rétention à J30 par des rats ayant interagi avec un démonstrateur « plain » (ctrl) ou un démonstrateur cumin (exp). * $p < 0,05$, t-test. $n = 12-13$ rats par groupe exp, $n = 4-6$ rats par groupe ctrl.



Ces données correspondent à une compilation d'expériences réalisées à des moments et par des expérimentateurs différents, mais confirment une tendance qui a déjà été remarquée et exploitée dans l'équipe.

2) Résultats comportementaux

Les résultats comportementaux du test de mémoire ancienne à J30 sont présentés en figure 66A.

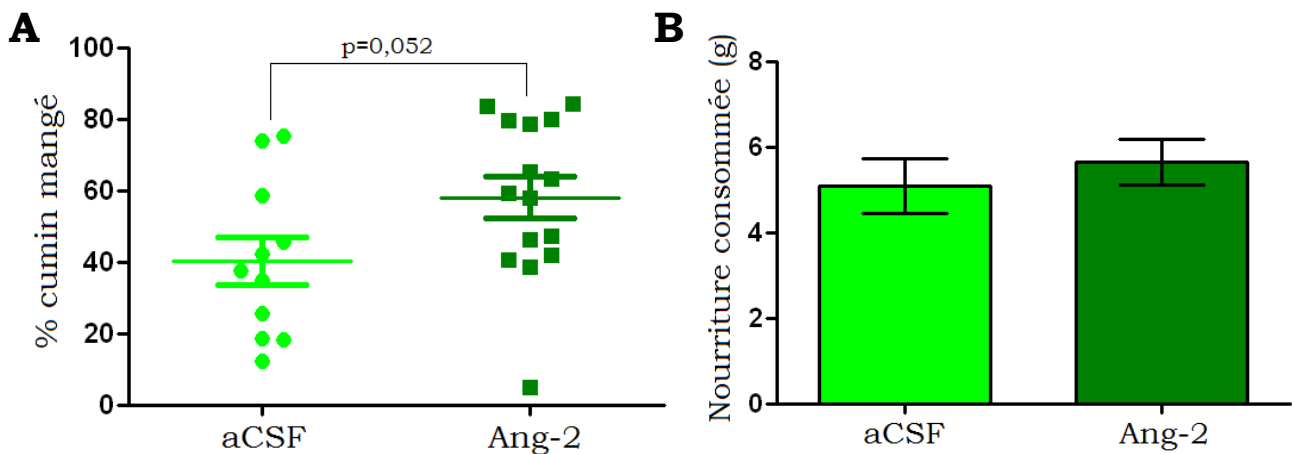


Figure 66 : Résultats comportementaux des rats ayant reçu des injections intracorticales d'Ang-2 ou d'aCSF (témoins). **(A)** Pourcentage de cumin mangé et **(B)** quantité totale de nourriture consommée (cumin + thym) lors du test de rétention à J30. n=11-15 rats par groupe.

Trois rats ayant reçu des injections d'Ang-2 ont été retirés de l'étude car le contrôle histologique (réalisé de façon systématique sur ces rats) a révélé une mauvaise position du site d'injection, et 2 rats témoins ont été retirés de l'étude en tant qu' « outsiders » présentant des performances s'éloignant beaucoup de la moyenne (le critère est de retirer un rat témoin lorsque sa performance est supérieure à la moyenne + 5SEM ou inférieure à la moyenne - 5SEM, calculés sans ce rat). Les résultats révèlent une amélioration de la performance mnésique à J30 chez les rats ayant été traités avec Ang-2 par rapport aux témoins (t-test non apparié $p=0,052$; très proche du seuil de significativité).

Nous avons contrôlé la quantité totale de nourriture mangée au cours du test de rétention (figure 66B) afin de s'assurer que les disparités observées ne sont pas dues à une différence de motivation entre les groupes, ce qui est bien le cas (t-test non apparié $p=0,52$; NS). De plus, nous avons vérifié que les injections d'Ang-2 n'inversent pas la préférence alimentaire chez des rats ayant interagi avec un démonstrateur « plain »

(figure 67), c'est bien le cas aussi (test de Mann Whitney, $p=0,53$; NS), les différences observées ne sont donc pas dues à un changement de préférence alimentaire.

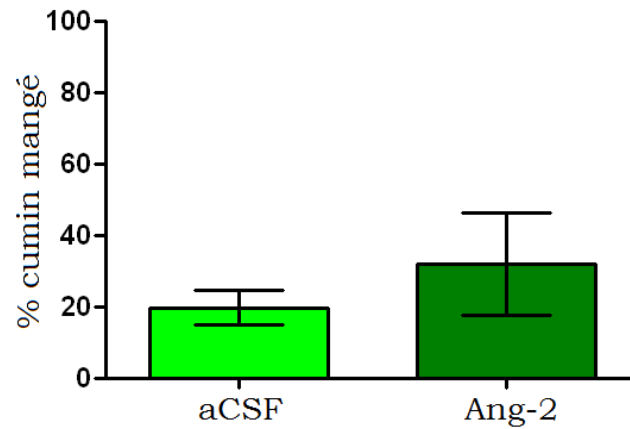


Figure 67 : Résultats au test de rétention à J30 de rats qui ont reçu suivant le même protocole de l'Ang-2 ou de l'aCSF, après avoir interagi avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle ; $n=4-6$ rats par groupe.

3) Analyse de la densité de vaisseaux sanguins et de la densité d'embranchements vasculaires

Les rats ayant participé au protocole décrit en figure 65 ont été perfusés immédiatement après le test de préférence à J30, leur cerveau a été tranché en coupes frontales qui ont été marquées à la lectine suivant le protocole utilisé dans le chapitre précédent ; nous procédons ici aux mêmes analyses du réseau vasculaire. Les lots de coupes pour lesquelles le marquage du réseau vasculaire n'était pas satisfaisant ont été écartés de l'étude, ce qui explique le nombre moindre de rats, mais il s'agit bien des mêmes rats en figure 68 qu'en figure 66.

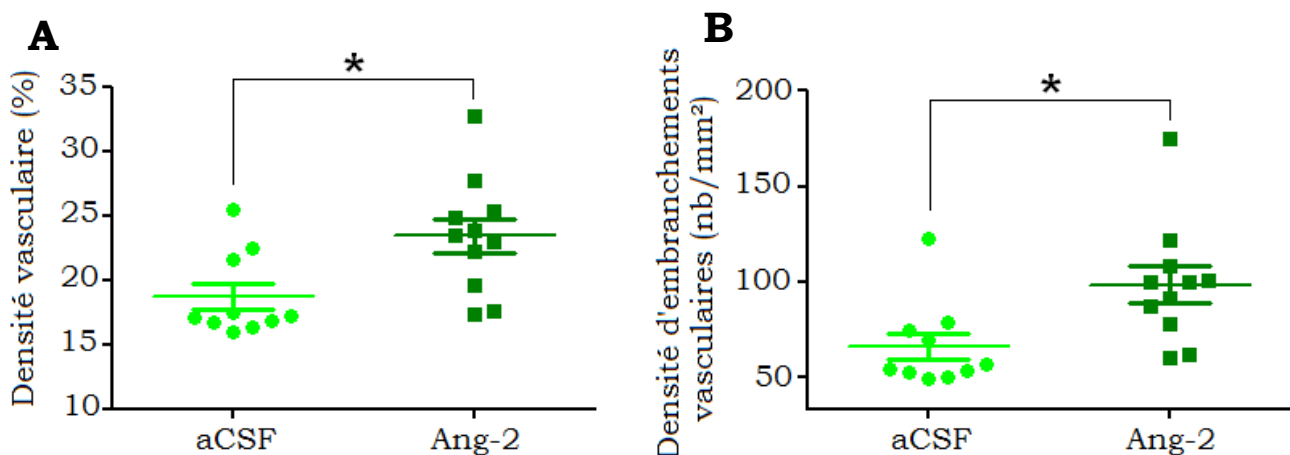


Figure 68 : Densité **(A)** de vaisseaux sanguins et **(B)** d'embranchements vasculaires dans la zone injectée de façon répétée. $n=10-11$ rats par groupe. * $p<0,05$ t-test.

Les rats ayant reçu des injections d'Ang-2 ont un réseau vasculaire plus développé (plus dense et plus d'embranchements de vaisseaux sanguins) au niveau de la région ciblée (t-test non apparié, $p < 0,05$ pour la densité vasculaire et pour la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins).

4) Conclusion

La stimulation de l'angiogenèse au moyen d'injections d'Ang-2 au sein du cortex orbitofrontal pendant la phase précoce du processus de consolidation mnésique (J0 à J6) conduit à l'amélioration des performances de mémoire ancienne de rats testés à J30 par rapport aux rats témoins.

Cette amélioration de performance mnésique est associée à une augmentation de densité vasculaire et de densité d'embranchements de vaisseaux sanguins dans la région injectée, par rapport aux rats témoins.

V. Discussion

Angiogenèse corticale et consolidation mnésique ?

Les études corrélatives (encore incomplètes mais en cours de réplication) suggèrent qu'une angiogenèse apparaît dans les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur au début du processus de consolidation mnésique. Nos données invasives suggèrent de plus son importance fonctionnelle, puisque le fait de la stimuler par une injection d'Ang-2 améliore la mémoire ancienne des rats et contribue à maintenir une densité vasculaire élevée lors du rappel à J30. Notons tout de même que la densité vasculaire et la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins sont plus élevées chez les rats injectés avec de l'aCSF que chez les rats non injectés dont les coupes de cerveau ont été analysées dans le chapitre précédent, partie II. Cela met en évidence qu'un remodelage vasculaire s'opère au niveau du site d'injection, ainsi Ang-2 agirait non seulement sur l'angiogenèse induite par l'interaction sociale mais aussi potentiellement sur le remodelage vasculaire induit par les injections. Il sera intéressant de réaliser ces mêmes analyses de densité de vaisseaux sanguins et d'embranchements vasculaires chez des rats recevant des injections d'aCSF ou d'Ang-2 après interaction avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle. Cela permettra de déterminer la part de changements vasculaires dus à l'action d'Ang-2 sur chacun de ces 2 phénomènes distincts.

Les expériences visant à bloquer spécifiquement l'angiogenèse cérébrale par injection d'ONAS ou de virus codant pour un shRNA, tous deux dirigés contre Ang-2, sont en fin de mise au point et nous devrions sous peu en obtenir les résultats préliminaires. Comme évoqué dans la discussion du chapitre précédent, nous émettons l'hypothèse que cette angiogenèse précoce permet la mise en place de nouvelles épines dendritiques au sein du réseau neuronal cortical qui sous-tendra à terme la trace mnésique ancienne. Il s'agira donc de vérifier si la stimulation de l'angiogenèse s'accompagne d'une facilitation de la mise en place de nouvelles épines dendritiques, et si à l'inverse son blocage conduit à une baisse du nombre d'épines dendritiques créées suite à l'induction d'une nouvelle mémoire olfactive associative. Un tel résultat permettrait de confirmer que l'angiogenèse précoce agit comme un mécanisme permissif à l'origine de la régulation des épines dendritiques.

Résultats négatifs obtenus avec le Vatalanib

Au cours de l'angiogenèse cancéreuse, les néovaisseaux sont poreux et la barrière hémato-encéphalique (BHE) ne joue plus aussi bien son rôle (Carmeliet and Jain,

2011). Ainsi, les anticancéreux administrés par voie systémique (orale) peuvent franchir la BHE au niveau des tumeurs cérébrales, et y agir de façon efficace aussi bien sur les vaisseaux que sur les cellules tumorales au sein du compartiment neuronal. Cependant, il n'est pas impossible qu'au cours de l'angiogenèse physiologique, les néovaisseaux ne soient pas aussi poreux que ceux qui se créent lors de l'angiogenèse tumorale. Il serait en effet inquiétant que la BHE devienne poreuse par endroits dès que l'on commence à consolider un nouveau souvenir !

La figure 69 illustre ce qu'il se passerait si le Vatalanib était incapable de passer la BHE au niveau des sites angiogéniques. Dans ce cas, les seules cibles du Vatalanib au sein du cerveau seraient les récepteurs au VEGF situés dans le compartiment vasculaire, côté sang. Or ceux qui sont susceptibles de recevoir un signal angiogénique sont situés au contraire côté compartiment neuronal. En effet, le signal déclenchant l'angiogenèse est très certainement un signal hypoxique provenant des neurones ; de plus si le signal angiogénique agissait côté sang celle-ci ne serait pas localisée dans certaines régions cérébrales seulement. Ainsi, l'incapacité du Vatalanib à passer la BHE dans le cas d'une angiogenèse physiologique, induisant des néovaisseaux moins poreux que lors de l'angiogenèse tumorale, pourrait expliquer nos résultats négatifs suite à son injection systémique.

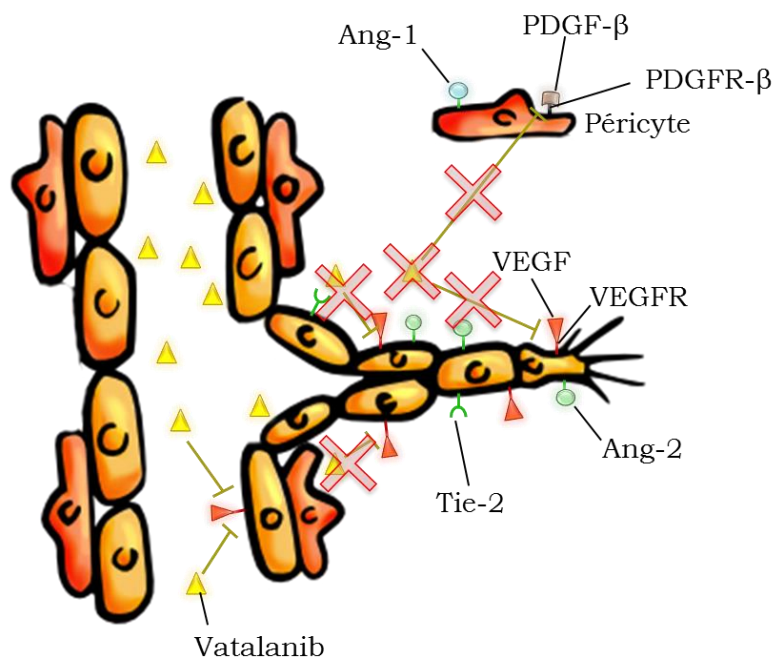


Figure 69 : S'il ne franchit pas la BHE, le Vatalanib peut devenir inefficace.

De plus, différents travaux montrent que le blocage de la fonction d'un récepteur peut conduire à sa surexpression (voir par exemple Follesa and Ticku, 1996 ; et pour une revue sur la régulation spatiale des récepteurs à activité tyrosine kinase voir Casaletto and McClatchey, 2012). Ainsi, le Vatalanib pourrait conduire à une surexpression des

VEGFR-2, en particulier dans le compartiment neuronal où rien ne viendrait les inhiber si la drogue ne franchit pas la BHE dans nos conditions, entraînant alors une stimulation de l'angiogenèse. Il ne s'agit ici que d'une hypothèse qui n'a pas été vérifiée, mais qui pourrait expliquer la tendance des groupes traités au Vatalanib en injections systémiques répétées (injections i.p. répétées à 25mg/kg, injections *per os* répétées à 50mg/kg) à obtenir de meilleures performances mnésiques que les groupes témoins.

Cette explication ne change rien au fait que les injections intracérébrales de Vatalanib (dont l'effet ne sera pas spécifiquement vasculaire) devraient être efficaces. Seul un essai d'injection intracorticale de Vatalanib a été mené, la dose utilisée étant basée sur des travaux montrant un effet *a priori* neuronal et non vasculaire. Afin de déterminer la concentration de Vatalanib efficace en injection intracérébrale pour bloquer l'angiogenèse, un modèle d'angiogenèse cérébrale serait très utile. Celui-ci présenterait une utilité non seulement pour le choix de la concentration de Vatalanib à utiliser, mais aussi pour vérifier que la concentration d'ONAS choisie est efficace, et pour tester nos virus contenant un shRNA dirigé contre Ang-2.

Tester l'efficacité de nos traitements

Un certain nombre de modèles d'angiogenèse périphérique sont couramment utilisés (Auerbach et al., 2003 ; Cimpean et al., 2011 ; Akhtar et al., 2002 ; Sawamiphak et al., 2010) mais sont difficilement transposables en intracérébral. Nous avons développé un modèle consistant en une seule injection de VEGF au sein du cortex orbitofrontal ou de l'hippocampe, qui permet de détecter des marqueurs de prolifération de cellules endothéliales dès 24h ainsi que le développement d'un réseau vasculaire plus dense et complexe au bout de quelques jours suite à l'injection. Ce modèle est détaillé en début de chapitre suivant dans lequel il a été utilisé à d'autres fins. Cependant, on sait que l'injection de VEGF s'accompagne de phénomènes inflammatoires (Croll et al., 2004 ; Kasselman et al., 2007) et induit un réseau vasculaire particulièrement tortueux, chaotique et fragile (Niimi, 2003 ; Rosenstein et al., 1998). On peut dès lors se demander si l'on induit ainsi une angiogenèse dont les mécanismes seront comparables à l'angiogenèse physiologique bien plus subtile que l'on souhaite bloquer.

La meilleure façon de tester nos traitements resterait de les appliquer en début de tâche de TSPA et de vérifier si l'angiogenèse induite par cette tâche est ou non bloquée. Notre première façon de la détecter par un marquage du réseau vasculaire suivi d'une analyse des images aurait demandé un travail fastidieux et de nombreux rats pour tester chaque outil à une concentration donnée. On pourrait plus facilement envisager de tester leur effet sur la prolifération cellulaire détectée à l'aide d'injections de BrdU, suivant le protocole utilisé dans le chapitre précédent, partie III. Ce protocole n'a été

validé qu'en fin de thèse, ce qui explique que nous ne l'ayons pas utilisé à ces fins. Concernant les outils moléculaires, il s'agira aussi de tester par Western Blot s'ils conduisent bien à la diminution de détection de la protéine Ang-2 dans les régions ayant reçu les ONAS ou le shRNA anti-Ang-2.

Choix de la région cible

Au vu des statistiques de densité d'embranchements vasculaires à J1 ainsi que des marquages BrdU (et des résultats préliminaires de qPCR qui ont été simplement évoqués), il semblerait que cibler le cortex cingulaire antérieur soit plus efficace que cibler le cortex orbitofrontal dans le but d'impacter sur l'angiogenèse corticale. Cela a été pris en compte pour les expériences invasives qui ont été relancées (ONAS et AAVs, décrites en fin de partie III). Si celles-ci s'avèrent plus prometteuses que les expériences de blocage de l'angiogenèse menées jusqu'ici, nous reproduirons aussi le protocole d'injections d'Ang-2 en ciblant cette fois le cortex cingulaire antérieur.

Implication fonctionnelle de l'angiogenèse hippocampique ?

Dans cette thèse, nous n'avons pas approfondi la piste de l'angiogenèse hippocampique précoce, ciblée uniquement dans le cadre de nos expériences invasives de blocage systémique de l'angiogenèse. Il serait intéressant de tester si le blocage de l'angiogenèse hippocampique précoce perturbe ou non la mémoire testée à J1 (alors dépendante de l'hippocampe) ainsi qu'à J30 (alors indépendante de l'hippocampe mais perturber celui-ci pourrait impacter sur le dialogue hippocampo-cortical en début de consolidation mnésique, et donc sur la formation de la mémoire ancienne). De la même façon, on pourrait reproduire le protocole d'injections d'Ang-2 cette fois-ci dans l'hippocampe et tester son impact potentiellement positif sur la mémoire ancienne.

Amélioration de la mémoire et densité vasculaire

Dans le chapitre précédent, nous montrions que l'augmentation de densité vasculaire n'est que transitoire, son augmentation à J1 n'est plus détectable à J30. Dans l'expérience de stimulation de l'angiogenèse à l'aide d'Ang-2, on maintient au contraire une augmentation de densité vasculaire et d'embranchements de vaisseaux sanguins jusqu'à J30. Au moins 2 hypothèses peuvent expliquer cela : l'injection d'Ang-2 exogène pourrait conduire à une plus forte induction d'Ang-1 endogène afin que la balance entre ces deux protéines reste équilibrée ; Ang-1 jouant un rôle dans la stabilisation des vaisseaux, cette stimulation artificielle pourrait induire la croissance de néovaisseaux qui seraient par la suite mieux stabilisés que dans le cadre de l'angiogenèse physiologique non stimulée. Il est aussi possible que cette stimulation induisant un

réseau vasculaire très dense dans les premiers jours soit suivie par une diminution progressive de la densité vasculaire, que cette augmentation de densité persiste encore un peu à J30 (il s'agit de ce que nous détectons) mais qu'elle disparaît plus tardivement (J60 ou plus tard). Il serait intéressant que cela soit le cas mais que le groupe injecté avec Ang-2 réalise toujours une performance mnésique plus élevée que les témoins à ce délai plus tardif, reproduisant ce qu'il se passe à J30 dans les conditions physiologiques (le réseau vasculaire retrouve sa densité initiale, mais les rats ont bien retenu l'information tout de même).

Nos résultats apportent au moins une certitude dans le cadre de la consolidation mnésique : le réseau vasculaire à l'état basal n'est pas optimal, augmenter sa densité dans la phase précoce du processus au sein d'une région corticale impliquée dans la prise en charge de la mémoire ancienne permet d'améliorer la performance des rats 30 jours après l'interaction sociale. Est-ce ici un principe plus général ? Augmenter la densité vasculaire dans une région impliquée dans la prise en charge d'un souvenir permet-il toujours d'améliorer les performances mnésiques, ou bien cela varie-t-il suivant la difficulté ou le type de mémoire (mémoire récente ou mémoire ancienne) sollicitée ? Le glucose, injecté immédiatement avant ou après un apprentissage, s'est révélé être capable d'améliorer les performances de rats déficitaires mais aussi de jeunes rats sains, à condition que le niveau de difficulté de la tâche soit assez élevé (McNay and Gold, 2001 ; Korol, 2002 ; Messier, 2004). Ainsi, l'efficacité de ce pro-mnésiant dépend de la difficulté de la tâche. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il en est de même avec la densité vasculaire : l'augmenter serait sans effet dans des tâches mnésiques simples, et aurait un effet pro-mnésiant uniquement dans des tâches difficiles avec une forte demande cognitive. Il s'agit là de l'objet du chapitre suivant.

Un principe généralisable ?

Augmentation de densité vasculaire et
amélioration des performances mnésiques
(résultats préliminaires)

I. Introduction : modèle d'angiogenèse cérébrale et tests mnésiques utilisés

Revenons sur quelques études déjà citées en partie II.3 de l'introduction générale, montrant que développer le réseau vasculaire à l'aide d'une administration exogène ou une surexpression de VEGF peut restaurer au moins en partie des performances mnésiques altérées par une pathologie ayant un impact sur l'intégrité des vaisseaux sanguins cérébraux. Cela a été montré dans le cas de modèles murins de la maladie d'Alzheimer testés dans une piscine de Morris (Wang et al., 2011) et dans un labyrinthe en T (Religa et al., 2013). De plus, les performances dans un test de piscine de Morris ont pu être améliorées chez des rats ischémiés (Zhang et al., 2012) ou ayant subi une lésion cérébrale traumatique (Xiong et al., 2011), en stimulant indirectement l'expression du VEGF et du VEGFR-2 via une injection respectivement de DL-3-n-Butylphthalide ou d'Erythropoïétine. *Ces études traitent chacune un cas pathologique, ne révélant pas si le VEGF peut jouer un rôle pro-mnésiant chez des animaux sains.*

Dans le chapitre précédent, nous montrons que stimuler l'angiogenèse, et donc augmenter au moins transitoirement la densité vasculaire en début de consolidation mnésique permet l'amélioration des performances de mémoire ancienne chez le rat sain. Dans ce chapitre, *nous souhaitons tester si l'augmentation de densité vasculaire permet l'amélioration des performances mnésiques de rats sains dans d'autres tests de mémoire, et si cet effet dépend de leur difficulté.* Nous avons donc 1) développé un modèle d'angiogenèse cérébrale induite par le VEGF, permettant une augmentation de densité du réseau vasculaire dans une région cérébrale donnée ; 2) testé l'effet d'un tel traitement sur un test mnésique simple, la reconnaissance de nouvelle position d'objet puis 3) sur un test mnésique plus complexe, le labyrinthe radiaire.

1) Provoquer l'angiogenèse cérébrale par injection de VEGF

Pourquoi le VEGF plutôt qu'Ang-2 comme dans notre expérience précédente ? Simplement car une injection d'Ang-2 sans la présence de facteurs trophiques conduit à la dégradation du réseau vasculaire (Lobov et al., 2002). Or ici, nous souhaitons simplement approfondir le lien entre augmentation de densité vasculaire avant l'apprentissage (par une injection de VEGF) et performances mnésiques. Il n'est ainsi plus question de phénomènes de plasticité vasculaire induites physiologiquement, mais uniquement de voir si le réseau vasculaire « de base » est ou non optimal pour la

réalisation de tâches mnésiques présentant une difficulté et un temps d'apprentissage variables.

Différentes études rapportent un effet du VEGF délivré par une pompe osmotique sur une période de plusieurs jours sur le développement du réseau vasculaire cérébral (Rosenstein et al., 1998 ; Krum et al., 2002 ; Croll et al., 2003 ; Kasselmann et al., 2007). D'autres utilisent un virus adéno-associé permettant une surexpression durable de VEGF dans une région cérébrale de la souris (Yang et al., 2003 ; Hao et al., 2007). Nous avons pour notre part voulu vérifier si une injection ponctuelle de VEGF au sein d'une région cérébrale suffit pour y induire le développement du réseau vasculaire au cours des jours qui suivent. La cinétique de développement du réseau vasculaire dans les jours qui suivent une injection intracérébrale de VEGF est décrite en partie II de ce chapitre.

Le VEGF n'a pas seulement un effet angiogénique : il promeut de plus la neuroprotection, la neurogenèse (Sun et al., 2003 ; Cao et al., 2004) et peut affecter la plasticité de neurones matures (Licht et al., 2011). Si l'on injecte le VEGF quelques jours avant l'épreuve mnésique, on devrait s'affranchir de son effet aigu sur la plasticité neuronale (ce qui n'aurait pas été possible avec la technique décrite par Yang et al., 2003 et Hao et al., 2007), ainsi que de sa capacité à stimuler la neurogenèse (les nouveaux neurones mettant environ 2 semaines avant de former des synapses fonctionnelles et 4 semaines avant d'atteindre un état stable, voir par exemple Gu et al., 2012) à condition que le test mnésique ne se fasse pas sur une durée de plusieurs semaines. Les deux épreuves mnésiques qui seront utilisées dans ce chapitre sont détaillées ci-après.

2) Test de reconnaissance de nouvelle position d'objet



Figure 70 : Rat réalisant une tâche de reconnaissance de nouvelle position d'objet. Celui-ci évolue dans une arène dont les parois sont transparentes afin que le rat puisse se repérer à l'aide d'indices sur les murs.

La tâche de reconnaissance de nouvelle position d'objet, tout comme la tâche de reconnaissance de nouvel objet, exploite la curiosité des rongeurs pour la nouveauté

(Berlyne, 1950) : en présence d'un élément familier et d'un élément nouveau (qu'il s'agisse d'un objet, d'une position, d'un environnement), le rat va naturellement explorer plus longtemps l'élément nouveau, jusqu'à ce qu'il devienne à son tour familier. Ce test repose sur une préférence innée pour la nouveauté et ne requiert donc pas d'apprentissage de règle. Il se décompose en 3 phases (figure 71) :

- l'*habituation* permet au rat de découvrir l'arène, son environnement, afin de réduire son état de stress au cours de la phase suivante ;
- durant la *familiarisation*, le rat est libre d'explorer 2 objets similaires positionnés dans des coins de l'arène ;
- lors du *test*, un des objets est bougé dans un autre coin de l'arène. Evaluer le pourcentage de temps passé sur l'objet déplacé permet de déterminer si le rat se souvient bien de la configuration précédente apprise durant la phase de familiarisation.

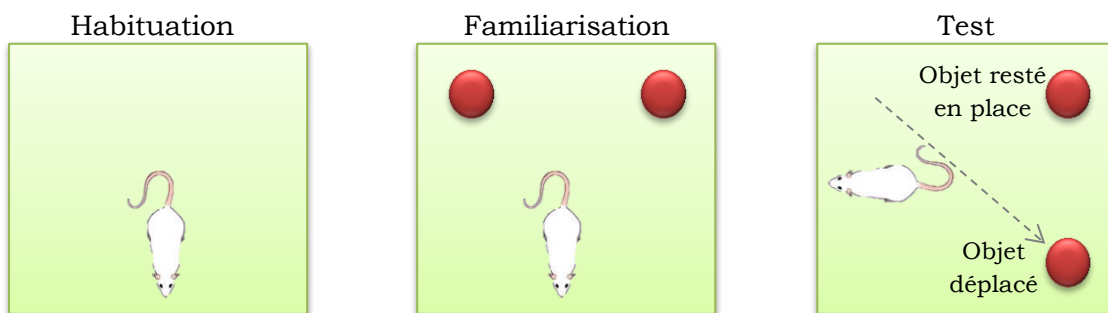


Figure 71 : Les phases du test de reconnaissance de nouvelle position d'objet.

Différents indices visuels placés sur les murs de la pièce permettent au rat de s'orienter. Celui-ci est à chaque fois déposé dans l'arène dos aux objets. Le minutage de ce protocole est précisé dans la partie « Matériels et méthodes ».

Les rats sont capables de correctement réaliser ce test spatial en discriminant entre l'objet déplacé (qu'ils vont explorer plus longuement) et l'objet resté en place. Cependant, cela n'est vrai que si l'on ne s'intéresse qu'aux premiers instants de la phase de test (par exemple la première minute dans l'arène ou les 15 premières secondes d'exploration d'objets), ensuite la nouvelle position devient familière aussi et donc sans intérêt particulier ; une trop longue période de test ne permet alors plus d'apprécier le phénomène (Dix and Aggleton, 1999). Pour que tous les rats encodent la même quantité d'information, la durée de la phase de familiarisation est variable, elle s'arrête lorsque les rats ont passé un même temps d'exploration d'objets (on considère que le rat explore un objet lorsque son nez s'y trouve à proximité). L'hippocampe est impliqué dans ce test de reconnaissance spatiale (Aggleton and Brown, 2005), sous réserve que le rat se serve bien de stratégies allocentriques basées sur des indices

visuels distribués dans l'espace (Steckler et al., 1998). Il s'agit de la région cérébrale que nous avons choisi de cibler.

3) Test de labyrinthe radiaire

Durant le test de labyrinthe radiaire, les rats ont une restriction de nourriture pour que leur poids atteigne 90% de leur poids de référence. Cela leur confère la motivation nécessaire pour aller chercher la nourriture (Choco Pops) placée au bout des bras. Après éventuellement quelques premiers essais au cours desquels les rats « balaient », passant d'un bras au suivant, les rats se repèrent à l'aide d'indices visuels placés sur les murs et vont *a priori* avoir recours à des stratégies de navigation spatiale allocentriques impliquant l'hippocampe, à nouveau choisi comme région cible. La figure 72 décrit les différentes phases du protocole commençant après 4 jours de restriction alimentaire.

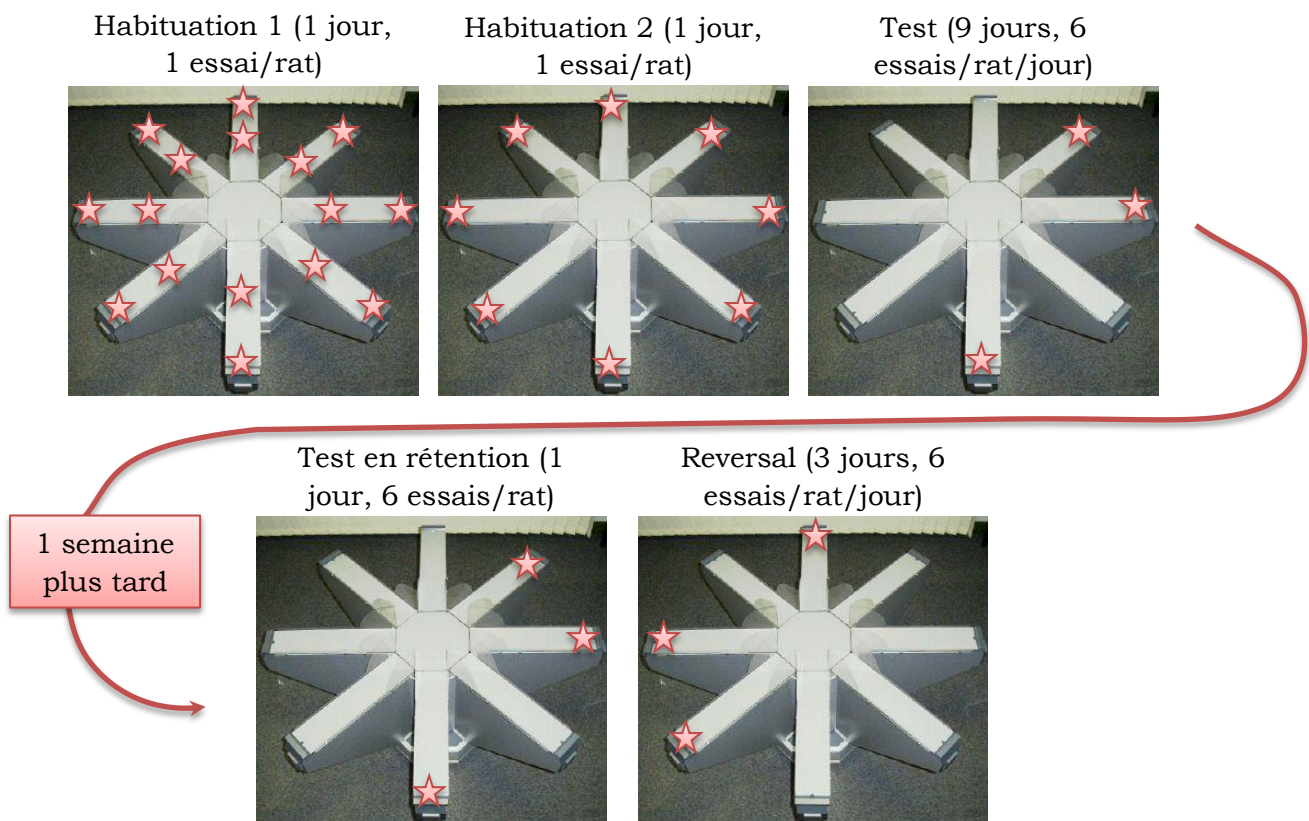


Figure 72 : Les phases du test de labyrinthe radiaire. Différents indices visuels placés sur les murs de la pièce permettent au rat de s'orienter. Celui-ci est à chaque fois déposé au milieu du labyrinthe. Les endroits où se trouvent les Choco Pops sont représentés par une étoile rouge.

L'*habitation* vise à mettre à l'aise le rat dans cet environnement et à réduire son stress lorsqu'il réalisera le test. Les habituations 1 et 2 durent jusqu'à ce que les rats aient visité les 8 bras.

Au cours des jours de *test*, le rat va apprendre la règle : seuls 3 bras sont appâtés, toujours les mêmes d'un essai et d'une journée à l'autre (mémoire de référence spatiale).

Après 9 jours d'apprentissage, le rat est laissé dans sa cage habituelle avec une restriction alimentaire le maintenant à 90% de son poids de référence et sans exercice à réaliser. On effectue 7 jours plus tard une expérience de *rétenion*, visant à tester la mémoire à long terme du rat. Suivent 3 jours de « *reversal* », où les 3 bras appâtés sont maintenant symétriquement opposés aux bras que le rat avait appris. Le « *reversal* » va permettre de voir la persistance des bras déjà appris et la réorientation vers les nouveaux bras ; cela demande au rat une grande flexibilité cognitive, une capacité à désapprendre pour réapprendre quelque chose de nouveau dans un contexte identique.

Contrairement au test inné de reconnaissance de nouvelle position d'objet dans lequel l'acquisition se fait en quelques minutes, le labyrinthe radiaire va demander un long apprentissage pour que le rat intègre et retienne la position des 3 bras appâtés. Nous supposons donc que ce dernier nécessite une plus forte demande cognitive. Le *reversal*, tout particulièrement, est un exercice difficile permettant de tester la flexibilité comportementale des rats, leur capacité à apprendre une nouvelle information interférant avec une information précédemment apprise.

Au cours des phases de test, de *rétenion* ou de « *reversal* », on calcule les erreurs (dites totales) par essai : si le rat retourne dans un bras appâté qu'il a déjà visité, ou s'il visite un bras non appâté, cela compte pour une erreur. Nous avons de plus évalué le pourcentage de bons choix (visite d'un bras appâté) au cours des 3 premiers bras visités à chaque essai.

II. Cinétique du développement du réseau vasculaire cérébral suite à une injection de VEGF

1) Protocole expérimental

Nous basant sur les concentrations injectées à l'aide de pompes osmotiques dans les articles cités en introduction, nos premiers essais ont été réalisés avec de faibles concentrations de VEGF, injecté à 50ng/mL. Une seule injection à cette concentration ne donnant aucun signe détectable d'angiogenèse, nous sommes passés à une concentration bien plus élevée de 10µg/mL, afin d'injecter en une seule fois une quantité de VEGF (10ng) proche de celle délivrée en une journée à l'aide de pompes osmotiques. Le protocole est décrit en figure 73.

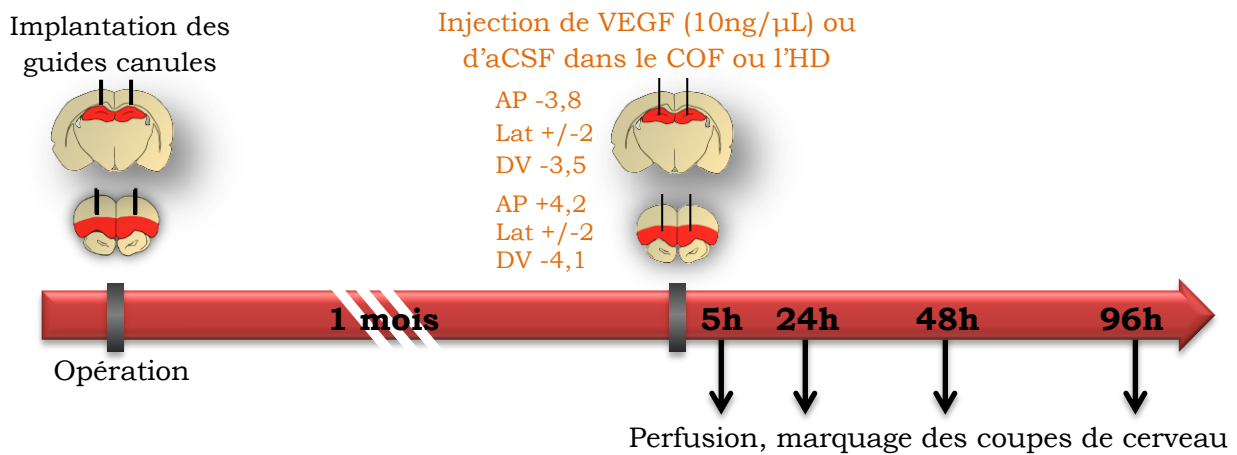
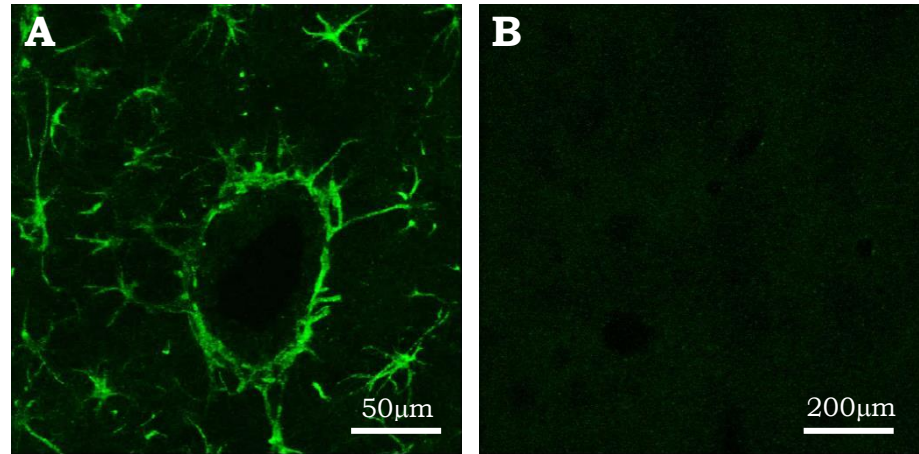


Figure 73 : Protocole expérimental. Les injections ont été réalisées soit dans le cortex orbitofrontal, soit dans l'hippocampe dorsal, les rats ont été sacrifiés à différents délais suite à l'injection de VEGF.

De façon surprenante, lorsque l'injection de VEGF (10ng/µL) est réalisée directement pendant l'opération sans que des guides canules soient implantés au préalable, aucun signe d'angiogenèse n'est visible. Cela peut être dû à un remaniement du réseau vasculaire (plus plastique ?) provoqué par l'implantation des guides, ou à l'influence de l'anesthésique. Un essai d'injection de VEGF sur un rat anesthésié auquel on avait implanté auparavant des guides canules n'a montré aucun signe d'angiogenèse, suggérant que l'injection de VEGF sous anesthésie n'est pas efficace pour stimuler l'angiogenèse. Le délai long d'un mois entre l'opération et l'injection de VEGF a été choisi suite à des marquages du récepteur Tie2 révélant encore la présence d'une inflammation 2 semaines après l'implantation des guides canules, alors qu'un tel phénomène n'était plus observé avec un délai de 30 jours (figure 74). Il était important de s'en affranchir, l'inflammation pouvant moduler les phénomènes angiogéniques que nous souhaitons justement étudier. Il est surprenant de voir ici des cellules

s'apparentant clairement à des astrocytes surexprimer Tie2. Il a été montré que les astrocytes peuvent exprimer Tie2 au sein de gliomes et que cela module leur capacité d'adhésion à la matrice extracellulaire (Lee et al., 2006), cependant la littérature ne précise pas de rôle potentiel des récepteurs Tie2 astrocytaires dans l'inflammation.

Figure 74 :
Marquage Tie2 de la
zone corticale
entourant les guides
canules implantés
(A) 2 semaines plus
tôt ou (B) 4
semaines plus tôt.



2) Résultats des marquages de marqueurs angiogéniques

L'**Endogline** est une protéine fortement exprimée au sein des cellules endothéliales proliférantes dans les tumeurs, ainsi qu'au niveau des sites d'inflammation (López-Novoa and Bernabeu, 2010). **Tie2** est un récepteur (d'Ang-1 et d'Ang-2) surexprimé au sein des cellules endothéliales proliférantes de la peau, des tumeurs, ainsi qu'au sein de la rétine de patients souffrant de désordres ischémiques (Peters et al., 2004) et serait aussi surexprimé lors du remodelage de gros vaisseaux cérébraux (Lin et al., 2000). Nous avons détecté ces protéines au site d'injection du VEGF essentiellement à un délai de 24h (figures 75B, 75E et 75F); un peu de marquage pouvait être observé pour certains rats aux délais de 5h (figures 75A et 75D) et 48h (figure 75C). Nous n'avons pas observé de tels marquages suite à l'injection d'aCSF. Les images de la figure 75 ont été prises au sein du cortex orbitofrontal ; des marquages similaires ont pu être observés au sein de l'hippocampe.

Le marquage Tie2 au délai de 5h (figure 75D) et parfois 24h (figure 75E) révèle la présence de monocytes exprimant Tie2 à proximité des vaisseaux, connus pour jouer un rôle dans le remodelage vasculaire en interagissant physiquement avec les néo-vaisseaux (Fantin et al., 2010 ; De Palma and Naldini, 2011 ; Nucera et al., 2011).

A partir du délai de 48h, l'effet du VEGF sur le réseau vasculaire marqué à la lectine se devine, et devient net à 96h (figure 76). 4 jours après injection de VEGF, le réseau vasculaire se développe, les vaisseaux sont plus dilatés et plus chaotiques, aussi bien dans le cortex orbitofrontal (figure 76D) que dans l'hippocampe (figure 76B), alors que de tels effets ne sont pas observés après injection d'aCSF (figures 76A et 76C).

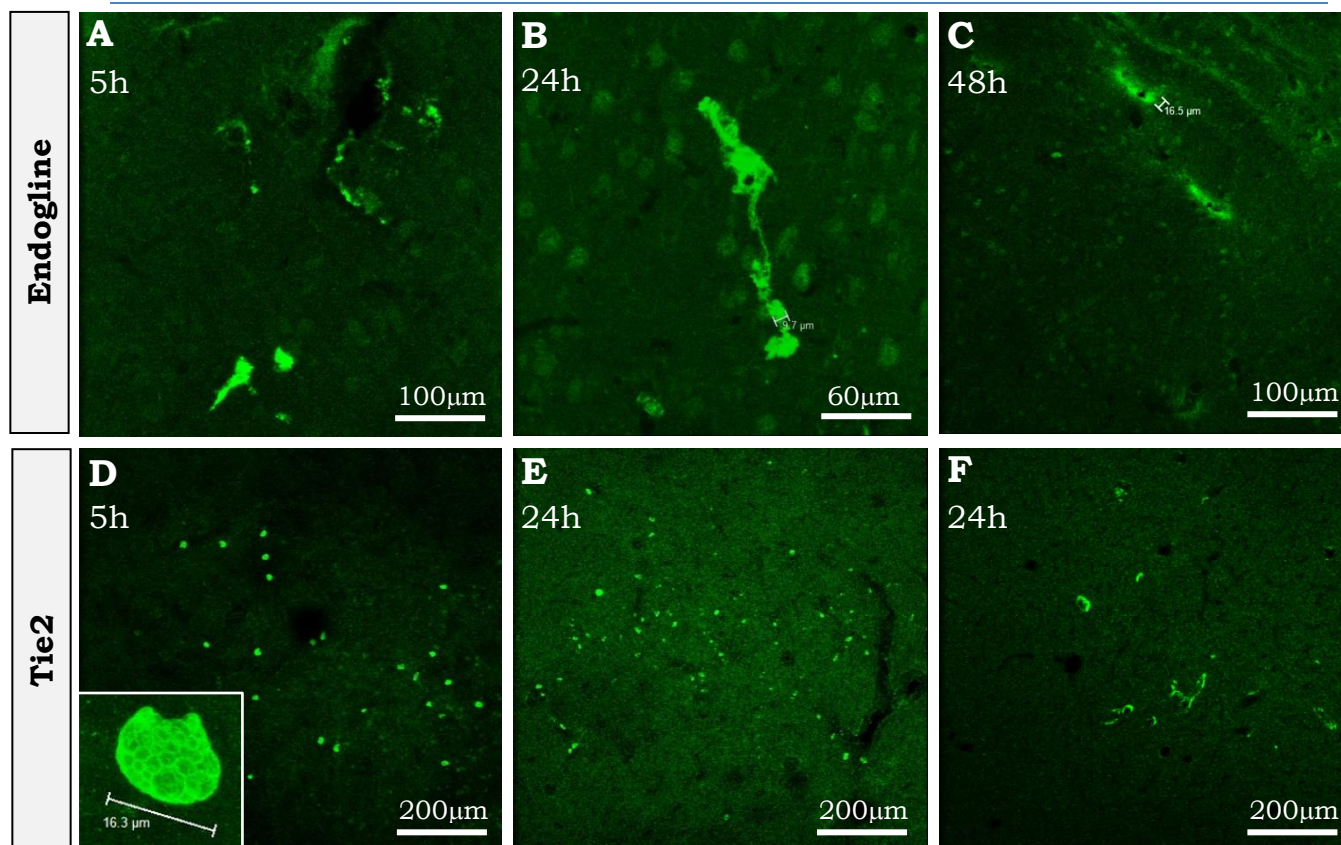
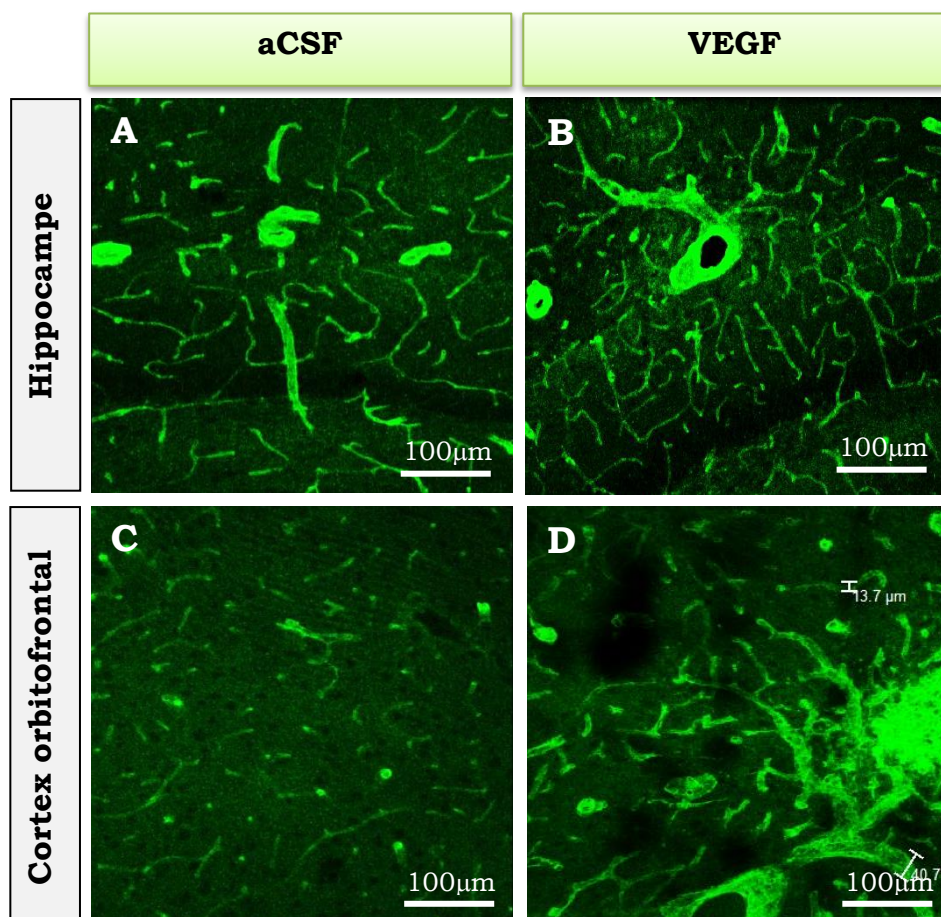


Figure 75 : Marquage Endogline vasculaire **(A)** 5h, **(B)** 24h et **(C)** 48h après injection de VEGF. Marquage Tie2 **(D)** 5h et **(E)**, **(F)** 24h après injection de VEGF. Les images **(D)** et **(E)** révèlent la présence de monocytes exprimant Tie2 à proximité des vaisseaux. n=4-6 rats par délai.

Figure 76 : Marquage lectine 4 jours après injection **(B),(D)** de VEGF ou **(A),(C)** d'aCSF dans **(A),(B)** l'hippocampe et **(C),(D)** le cortex orbitofrontal. n=2 rats par condition.



3) Conclusion

Cinq à 48 heures après injection de VEGF dans l'hippocampe ou le cortex orbitofrontal, du marquage Tie2 et Endogline est visible, indiquant une prolifération cellulaire et l'intervention de monocytes exprimant Tie2 dans le remodelage vasculaire.

Quatre jours après injection de VEGF, on observe un réseau vasculaire plus développé, tortueux, chaotique, comprenant des vaisseaux plus dilatés, aussi bien dans l'hippocampe que dans le cortex orbitofrontal, alors que de tels effets ne sont pas visibles du côté où l'aCSF a été injecté.

Ainsi, en injectant le VEGF (et l'aCSF pour les témoins) selon ce protocole dans l'hippocampe 4 jours avant une épreuve mnésique dépendante de cette région cérébrale, nous espérons pouvoir évaluer si un réseau vasculaire hippocampique plus développé permet ou non l'amélioration des performances dans cette tâche.

III. Développement du réseau vasculaire hippocampique et performances dans le test de reconnaissance de nouvelle position d'objet

1) Implication de l'hippocampe dorsal

Nous avons tout d'abord vérifié que dans nos conditions expérimentales, ce test mnésique était bien dépendant de l'hippocampe dorsal. Pour ce faire, nous avons inactivé transitoirement l'hippocampe au moment de la phase de familiarisation, via une injection de CNQX (antagoniste des récepteurs AMPA) 1h avant (figure 77).

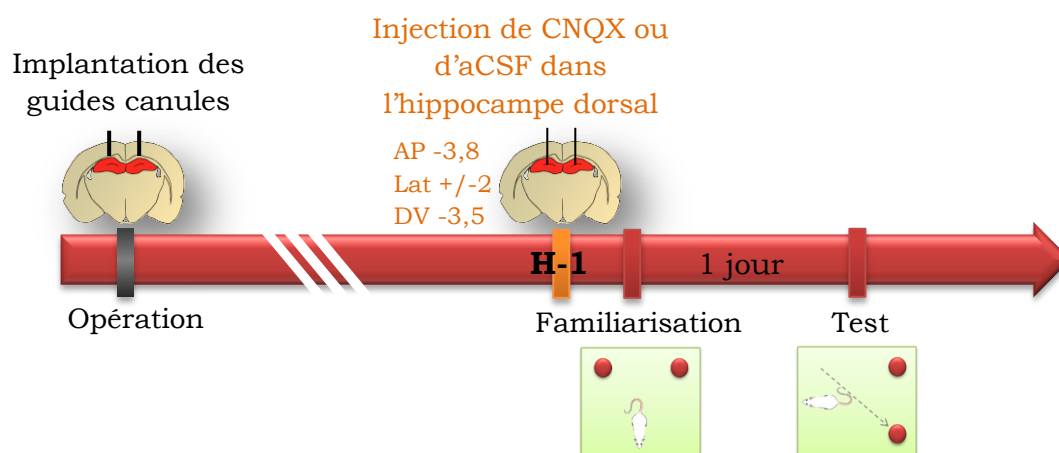


Figure 77 : Protocole expérimental. Le test est réalisé un jour après la familiarisation.

Le délai d'un jour entre les phases de familiarisation et de test a été choisi afin que les rats se souviennent encore de la configuration d'origine, mais que leurs performances ne soient pas trop élevées pour éviter un effet plafond empêchant de détecter une amélioration de ces performances dans l'expérience suivante. Les résultats sont présentés en figure 78.

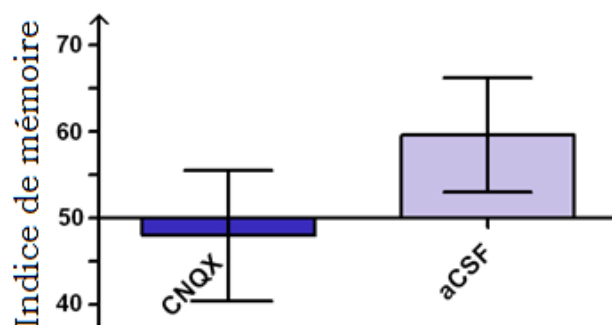


Figure 78 : Résultats au test de reconnaissance de nouvelle position. L'indice de mémoire correspond au pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé par rapport au temps d'exploration d'objets total, fixé à 15 secondes. Ainsi, 50 correspond au niveau de hasard (le rat passe autant de temps à explorer l'objet déplacé que l'objet resté en place). n=6,8 rats par groupe.

Les rats traités au CNQX performant au niveau de hasard (48,0%) alors que les rats ayant reçu de l'aCSF passent plus de temps à explorer l'objet déplacé (59,7%). Les effectifs mériteraient d'être au moins doublés afin d'espérer atteindre un effet significatif (test de Mann Whitney CNQX versus aCSF, $p=0,49$), pour autant ces données préliminaires suggèrent bien que l'hippocampe dorsal est impliqué dans la réalisation de cette tâche, et serait nécessaire à la formation d'une nouvelle mémoire de reconnaissance de position dans nos conditions expérimentales. Cela valide notre site d'injection hippocampique du VEGF ou de l'aCSF dans l'expérience suivante.

2) Effet de l'injection de VEGF intrahippocampique

Nous avons ensuite effectué une injection de VEGF (ou d'aCSF pour les témoins) dans l'hippocampe dorsal des rats 4 jours avant la familiarisation (figure 79), de sorte que les rats traités au VEGF aient un réseau vasculaire hippocampique plus développé lors de l'apprentissage que les témoins, comme cela a été décrit dans la partie II.

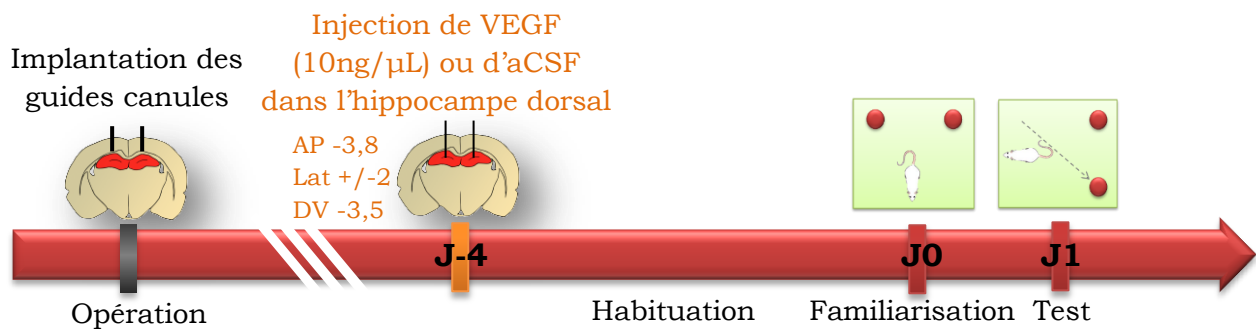


Figure 79 : Protocole expérimental.

Les résultats sont présentés en figure 80.

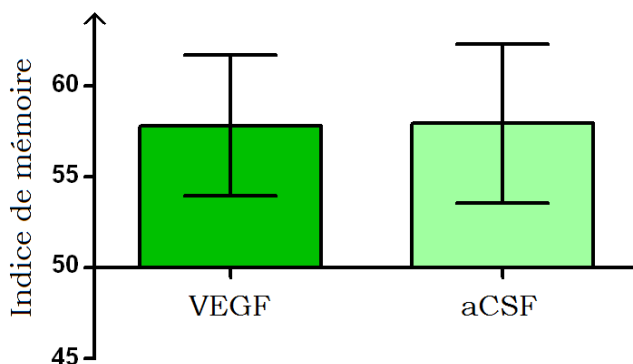


Figure 80 : Résultats au test de reconnaissance de nouvelle position d'objet. L'indice de mémoire correspond au pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé par rapport au temps d'exploration d'objets total, fixé à 15 secondes. $n=12,13$ rats par groupe.

Les rats traités au VEGF et les témoins obtiennent des performances similaires (VEGF 57,8% en moyenne ; aCSF 57,9% en moyenne ; t-test non apparié $p=0,99$). Ce résultat rejoint celui de l'étude de Licht et al. (2011) montrant que la surexpression du VEGF sur une longue période conduit à un développement durable du réseau

vasculaire hippocampique, mais que les souris ne présentent pas pour autant de performances mnésiques améliorées dans un test de peur conditionnée.

Afin de déterminer si l'induction d'un réseau vasculaire plus « plastique » au moment de l'apprentissage pouvait améliorer les performances mnésiques, nous avons testé quelques rats pour lesquels l'injection de VEGF ou d'aCSF a été réalisée la veille de la familiarisation. Ainsi, le réseau vasculaire est apte à être remodelé précisément en fonction de la demande cognitive lors de la familiarisation, et est susceptible d'être « plus fonctionnel » que celui que l'on développe artificiellement plusieurs jours avant. Les résultats, présentés en figure 81, ne révèlent de nouveau aucune différence entre le groupe VEGF (56,3%) et le groupe aCSF (56,6% ; test de Mann Whitney $p=0,81$).

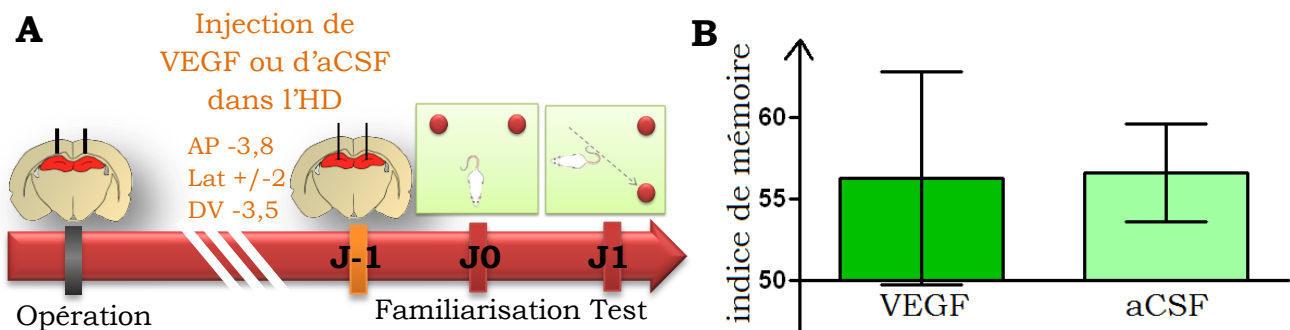


Figure 81 : (A) Protocole expérimental et **(B)** résultats au test de reconnaissance de nouvelle position. $n=4,5$ rats.

3) Conclusion

Développer le réseau vasculaire hippocampique à l'aide d'une injection de VEGF 1 ou 4 jours avant une épreuve de reconnaissance de nouvelle position ne modifie pas les performances mnésiques des rats testés le lendemain de l'apprentissage. Ainsi, le réseau vasculaire de base semble déjà optimal pour effectuer une telle tâche. Ces résultats ont fait l'objet d'un poster présenté au congrès de la Society for Neuroscience à San Diego en novembre 2013, il se trouve en annexe B.

Dans la partie suivante, nous testons un protocole similaire appliqué à une épreuve mnésique plus difficile et dont l'apprentissage nécessite plusieurs jours (au contraire de cette tâche acquise en à peine quelques minutes), le labyrinthe radiaire. Les expériences et les résultats qui y sont décrits sont le fruit du travail d'Anne-Lise Durand, stagiaire en Master 1 de l'Université de Poitiers.

IV. Développement du réseau vasculaire hippocampique et performances dans le test de labyrinthe radiaire

1) Protocole expérimental

Les différentes étapes du test de labyrinthe radiaire ont déjà été détaillées en introduction ; s'ajoutent ici 2 injections de VEGF ou d'aCSF, 4 jours avant le premier jour de test ainsi qu'après les 9 jours d'apprentissage (figure 82). Cette 2^{ème} injection a été réalisée dans l'objectif de maintenir l'augmentation de densité vasculaire jusqu'à la fin du reversal.

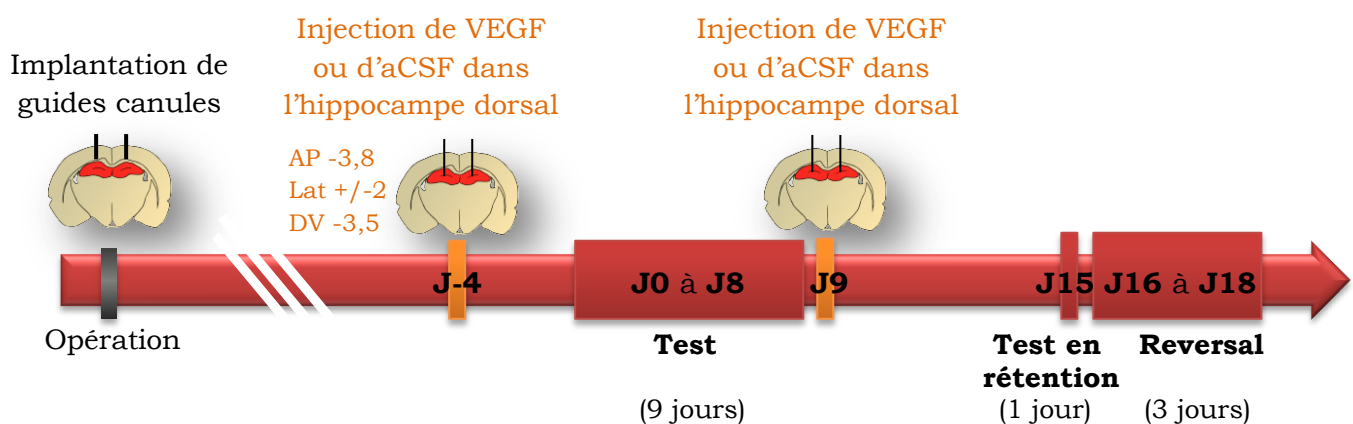


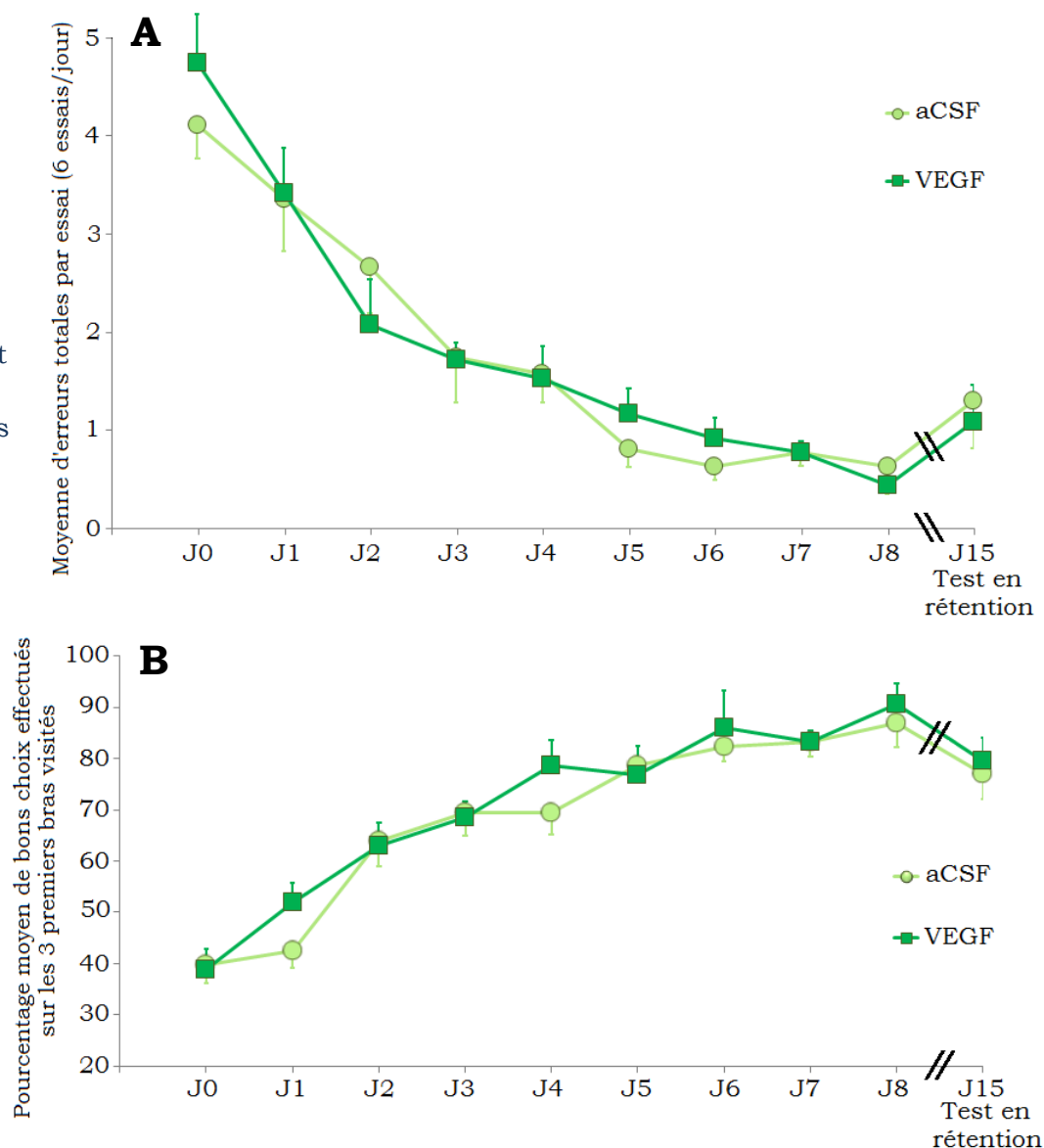
Figure 82 : Protocole expérimental. Les rats sont sacrifiés le lendemain du dernier jour de reversal afin de pouvoir analyser leur réseau vasculaire hippocampique.

2) Effet de l'injection de VEGF intrahippocampique

La figure 83A représente les erreurs totales moyennes effectuées par essai durant les 9 jours d'acquisition et lors du test en rétention, une semaine plus tard. La figure 83B illustre le pourcentage de bons choix effectués (bras appâtés) sur les 3 premiers bras visités à chaque essai durant les 9 jours d'acquisition et lors du test en rétention.

Les rats des groupes aCSF et VEGF apprennent la règle, faisant de moins en moins d'erreurs au fil des jours d'acquisition. Contrairement à nos attentes, l'injection de VEGF au sein de l'hippocampe dorsal 4 jours avant le premier jour de test (J0) n'accélère pas la vitesse d'apprentissage de la tâche qui est similaire pour les groupes aCSF et VEGF (figures 83 et 85). Les 2 injections de VEGF n'entraînent pas non plus d'amélioration de la performance au test en rétention effectué à J15.

Figure 83 :
Acquisition de la
tâche (J0 à J8) et test
en rétention (J15).
(A) Moyenne d'erreurs
par essai et **(B)**
pourcentage moyen
de bons choix
effectués sur les 3
premiers bras visités
à chaque essai. n=6
rats par groupe.



Le lendemain du test en rétention, les rats participent durant 3 jours au reversal, devant alors désapprendre les 3 bras jusqu'alors appâtés et en apprendre 3 nouveaux. Le nombre initialement élevé d'erreurs totales effectuées à chaque essai diminue rapidement au cours des 3 jours de test (figure 84A en page suivante). Il semble ici que les rats traités au VEGF fassent légèrement moins d'erreurs totales que les témoins à J16, premier jour du reversal.

Cet effet apparaît plus clairement lorsque l'on ne s'intéresse qu'aux 3 premiers bras visités à chaque essai (figure 84B). Chez les rats témoins traités à l'aCSF, les performances à J16 sont très mauvaises en raison de la persistance des anciens bras appris. Au contraire, les 6 essais du premier jour de reversal suffisent aux rats traités au VEGF à apprendre les nouveaux bras et désapprendre les anciens, plus rapidement que les témoins (figures 84B et 85). Dès le second jour du reversal, les performances du groupe aCSF rejoignent celles du groupe VEGF.

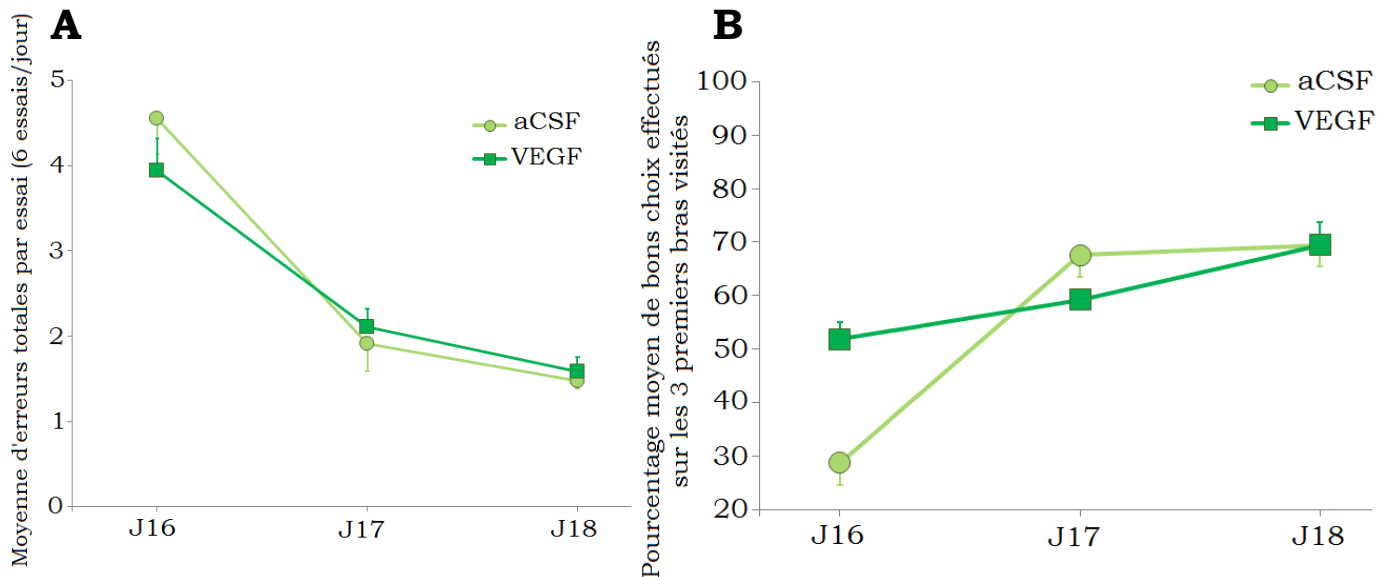


Figure 84 : Test de reversal (J16 à J18). **(A)** Moyenne d'erreurs totales par essai et **(B)** pourcentage moyen de bons choix effectués sur les 3 premiers bras visités à chaque essai. n=6 rats par groupe.

Le groupe VEGF fait ainsi preuve d'une meilleure flexibilité cognitive que le groupe témoin, étant capable d'apprendre plus vite de nouveaux bras au début du reversal à J16, alors qu'aucune différence dans la vitesse d'apprentissage de la tâche n'était observée au début de l'acquisition à J0 (figure 85).

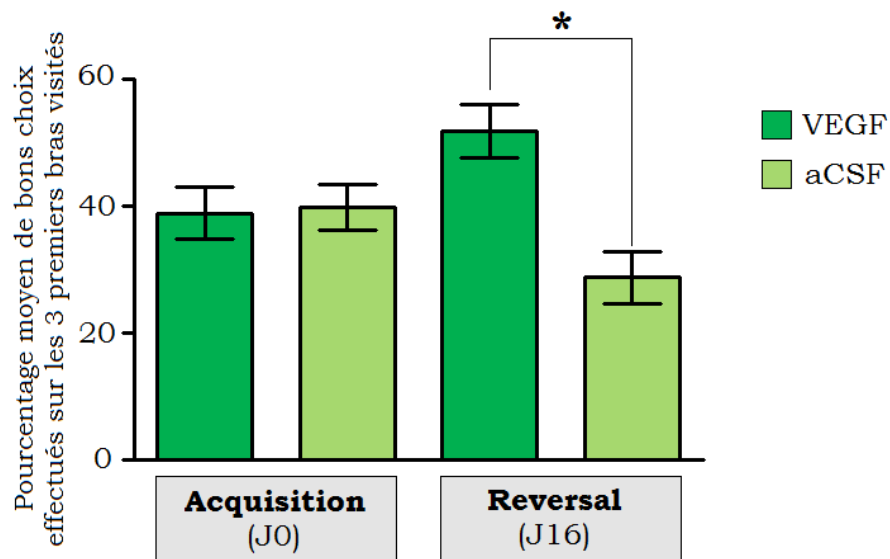


Figure 85 : Pourcentage moyen de bons choix effectués sur les 3 premiers bras visités lors des 6 essais du premier jour d'acquisition (J0) ou de reversal (J16). n=6 rats par groupe. Test de Mann Whitney VEGF versus aCSF à J16 $p=0,011$, à J0 $p=1,00$.

* $p<0,05$.

3) Analyse *a posteriori* du réseau vasculaire hippocampique

Les rats ont été perfusés à J19, le lendemain du dernier jour de reversal. Pour chaque rat, une coupe tous les 120µm a été marquée à l'aide d'un anticorps dirigé contre RECA-1 afin de visualiser le réseau vasculaire au niveau de l'hippocampe dorsal. Le calcul de la densité vasculaire et de la densité d'embranchements sanguins a ensuite été effectué (figure 86). Le protocole précis est détaillé dans la partie « Matériels et méthodes ».

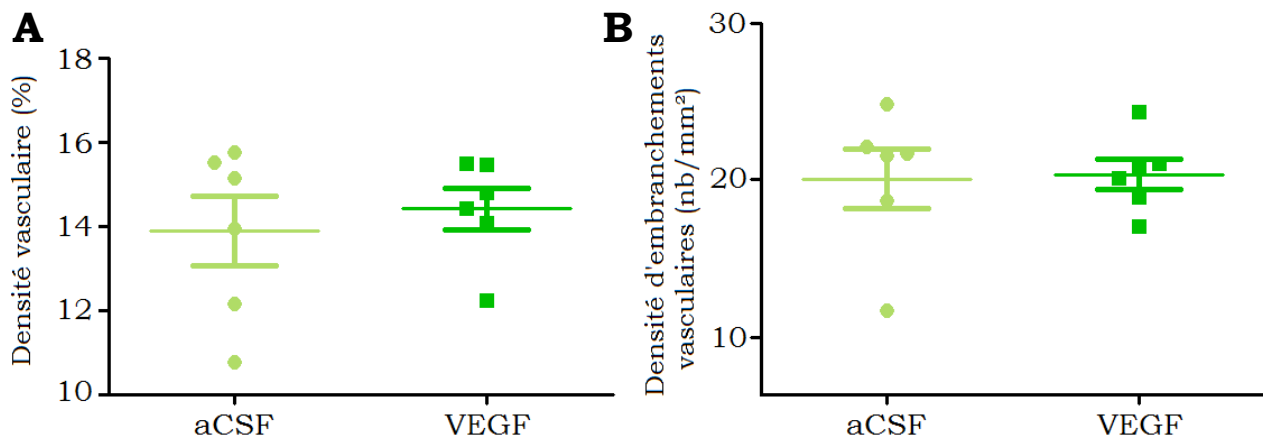


Figure 86 : Analyse du réseau vasculaire au sein de l'hippocampe dorsal. **(A)** Densité vasculaire et **(B)** densité d'embranchements vasculaires. n=6 rats par groupe.

Il apparaît que le protocole d'injection choisi est insuffisant pour maintenir l'augmentation de densité vasculaire (test de Mann Whitney, $p=0,59$) et l'augmentation de densité d'embranchements de vaisseaux sanguins (test de Mann Whitney, $p=0,94$) jusqu'à J19. Un protocole à deux injections aigues n'est ainsi pas aussi efficace que celui utilisé par Licht et al. (2011) ayant surexprimé le VEGF au sein de l'hippocampe en continu sur une période de plusieurs semaines, et observant le maintien de l'augmentation de densité vasculaire un mois après la fin de cette surexpression.

4) Conclusion

D'après la partie II, notre protocole d'injection du VEGF conduit au développement du réseau vasculaire hippocampique à J0 et J13, chez les rats ayant reçu la drogue 4 jours plus tôt. Nous ne connaissons pas l'état du réseau vasculaire hippocampique lors du test en rétention à J15, ni lors du début du reversal à J16, mais nos résultats indiquent qu'un réseau vasculaire hippocampique plus développé n'accélère pas l'acquisition de la tâche à J0. En revanche, le groupe VEGF réalise de meilleures performances lors du premier jour de reversal, faisant ainsi preuve d'une meilleure flexibilité cognitive.

V. Discussion

Les résultats du test de reconnaissance de nouvelle position d'objet et ceux du début d'apprentissage en labyrinthe radiaire révèlent que pour des tâches mnésiques simples ou répétées, la structure du réseau vasculaire est déjà optimale : augmenter sa densité par injection de VEGF ne conduit pas à l'amélioration des performances mnésiques ni à une augmentation de la vitesse d'acquisition de la tâche. Cela donne du relief au fait que l'injection d'Ang-2 dans le cortex orbitofrontal suite à l'interaction sociale permette une amélioration des performances de mémoire ancienne, expérience présentée en fin du chapitre précédent.

Il est possible qu'en augmentant la difficulté du labyrinthe radiaire (en diminuant le nombre d'essais quotidiens des rats, par exemple), on aurait pu voir un effet du VEGF sur la rapidité d'acquisition de la tâche. Nous attendions un tel effet qui n'a pu être observé dans notre expérience, mais on ne peut exclure qu'un effet plafond nous ait empêchés d'améliorer les performances de rats apprenant déjà rapidement.

VEGF et test de TSPA

Un groupe de rats a reçu des injections de VEGF au sein du cortex orbitofrontal suite à l'interaction sociale de la tâche de TSPA à J0, puis J2, J4 et J6 (suivant un protocole similaire à l'expérience de la partie IV du chapitre précédent, recourant à des injections d'Ang-2). Celui-ci présente des performances mnésiques à J30 meilleures que les rats témoins recevant de l'aCSF (67% de cumin mangé lors du test de préférence contre 48% pour les témoins, n=4-5 rats par groupe, voir figure 87A). Il ne s'agit ici que d'une tendance qui demande à être confirmée en complétant les groupes, mais elle appuie l'idée que le réseau vasculaire développé par le VEGF est bien fonctionnel, malgré les phénomènes inflammatoires (Croll et al., 2004 ; Kasselmann et al., 2007) et la perméabilité accrue de la barrière hémato-encéphalique (Rosenstein et al., 1997 ; Krum et al., 2002) pouvant l'accompagner.

En revanche, lorsque le VEGF est injecté à J-4 avant l'interaction sociale puis à J9, de la même façon que dans les expériences de ce chapitre, aucune amélioration des performances de mémoire ancienne à J30 n'est observée (figure 87B).

Il ne s'agit ici que de résultats préliminaires : les sites d'injection n'ont pas été vérifiés par contrôle histologique, et les groupes injectés à J-4 et J9 sont bien trop petits pour pouvoir en tirer des conclusions fiables. Nous tenions cependant à évoquer ces résultats car ils permettent de discuter quant à la possibilité de comparer les données obtenues

dans ce chapitre et celles de la partie IV du chapitre précédent, recourant à des injections d'Ang-2.

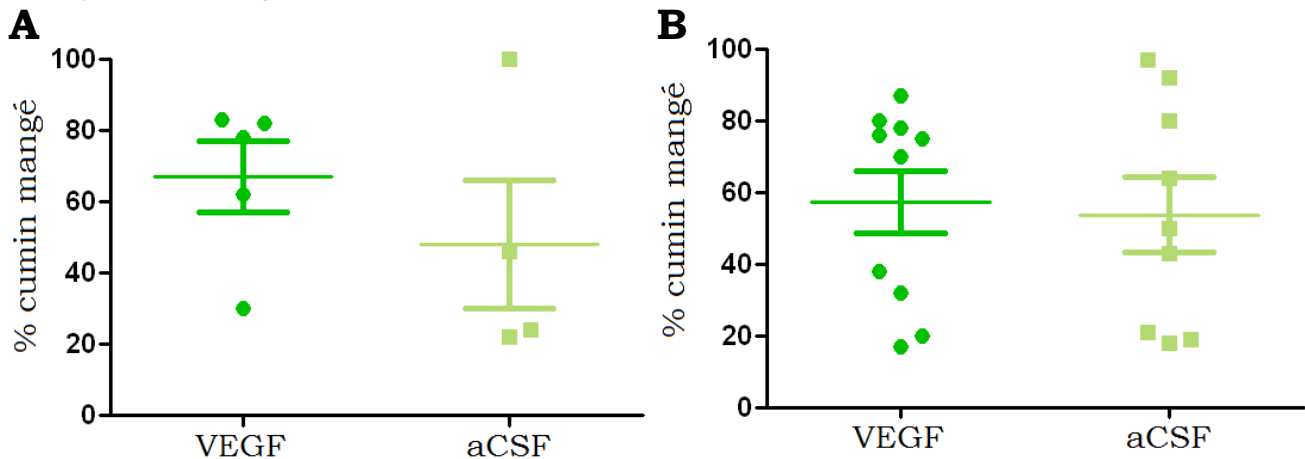


Figure 87 : Résultat du test de TSPA réalisé à J30 sur des rats ayant reçu des injections de VEGF ou d'aCSF **(A)** à J0, J2, J4 et J6 (test de Mann Whitney, $p=0,41$, $n=4-5$ rats par groupe) ou **(B)** à J-4 et J9 (test de Mann Whitney, $p=1,00$, $n=9-10$ rats par groupe).

Quatre hypothèses peuvent expliquer que les résultats semblent différer entre ces deux protocoles d'injections de VEGF :

- le protocole d'injection du VEGF à J0, J2, J4 et J6 a un effet plus marqué sur le développement du réseau vasculaire cortical, il en permet le maintien plus longtemps (jusqu'à J30?) car les injections sont plus nombreuses et répétées ;
- les injections aiguës (J-4 et J9) ne développent qu'un réseau vasculaire immature (voire fuitieux) alors que les injections répétées de VEGF (J0, J2, J4 et J6) génèrent un réseau vasculaire mature opérationnel ;
- le protocole d'injection du VEGF à J0, J2, J4 et J6 agit sur la plasticité neuronale au sein du cortex orbitofrontal, y promeut la LTP, permettant un meilleur développement du réseau neuronal sous-tendant à terme la mémoire ancienne ;
- le fait de stimuler un phénomène physiologique (l'angiogenèse corticale précoce) est plus efficace que simplement développer « artificiellement » le réseau vasculaire avant (à J-4) et après (à J9).

Ces résultats soulignent que l'on peut malheureusement difficilement comparer l'expérience d'injections d'Ang-2 (à J0, J2, J4, J6) au sein du COF en début de consolidation mnésique et les expériences présentées dans ce chapitre (recourant à des injections de VEGF à J-4 et J9).

Ainsi, dans l'amélioration de la performance de mémoire ancienne suite à l'injection d'Ang-2 au sein du cortex orbitofrontal, plusieurs facteurs sont susceptibles d'avoir leur importance : 1) les injections sont réalisées à une dose et un timing appropriés, 2) on

stimule alors un phénomène physiologique, 3) la complexification progressive du réseau neuronal cortical (déjà étiqueté) en début de consolidation mnésique repose sur une plasticité vasculaire (pas forcément nécessaire aux modifications neuronales hippocampiques permettant l'apprentissage et la mémorisation à court terme d'une tâche spatiale).

Il est décevant, à la fin de ce chapitre, de ne pouvoir apporter plus de conclusions et laisser de nombreuses questions ouvertes. L'objectif initial de ces expériences était la valorisation de notre modèle d'angiogenèse cérébrale en l'appliquant à des tâches comportementales, dans lesquelles nous espérions pouvoir mettre en évidence des améliorations de performances mnésiques dues à la densification du réseau vasculaire (au moins pour le labyrinthe radial). Il s'agissait, en marge du noyau dur de la thèse, de produire un travail susceptible d'être publié sans éventer nos résultats vasculaire/consolidation mnésique qui doivent encore être complétés. De fait, les résultats n'ont pas été ceux que nous attendions, et en tirer des conclusions demanderait encore beaucoup de travail. Ils apportent tout de même une conclusion intéressante : il ne suffit pas de densifier le réseau vasculaire pour améliorer les performances dans un test de reconnaissance de nouvelle position d'objet, ni la vitesse d'acquisition dans une tâche de labyrinthe radiaire (avec 6 essais consécutifs par jour). Cela donne de la valeur à notre expérience Ang-2 (chapitre précédent, partie IV), plus subtile qu'elle n'aurait pu le paraître au premier abord.

Résultats du reversal : neurogenèse ou angiogenèse ?

Le seul effet observé dans les expériences présentées dans ce chapitre (labyrinthe radiaire et test de reconnaissance de nouvelle position d'objet) porte sur les performances au début du test de reversal. Les injections de VEGF confèrent aux rats ainsi traités une meilleure flexibilité cognitive : ils assimilent très rapidement que les bras ont changé et sont à même de désapprendre les anciens bras et apprendre les nouveaux dès le premier jour de reversal. Les injections de VEGF ont été réalisées 20 et 7 jours avant le reversal. Ainsi, à la différence des 9 jours d'apprentissage dans le labyrinthe radiaire et du test de reconnaissance de nouvelle position, on ne peut ici totalement s'affranchir de l'effet du VEGF sur la neurogenèse. L'injection faite 20 jours avant le reversal est susceptible d'avoir stimulé la neurogenèse hippocampique, induisant de nouveaux neurones pouvant déjà former des synapses fonctionnelles 20 jours plus tard et ainsi contribuer à l'amélioration des performances au début du reversal. D'autres études appuient l'idée que la neurogenèse joue un rôle dans la flexibilité comportementale ainsi que dans la prévention des interférences entre nouveaux et anciens souvenirs (pour revue, voir Stuchlik, 2014). Les neurones

nouvellement créés participant à l'acquisition d'une nouvelle mémoire semblent au contraire contribuer à son renforcement, étant plus fortement recrutés lors du test en rétention que lors du reversal (Trouche et al., 2009), ce qui n'exclut pas que d'autres néo-neurones ou un réseau vasculaire plus dense puissent jouer un rôle important dans les performances au reversal.

L'étude de Burghardt et al. (2012) montre un résultat extrêmement similaire au nôtre : devant apprendre à éviter une zone où elles reçoivent un choc électrique, des souris dont l'hippocampe a été irradié aux rayons X (afin d'y supprimer la capacité de neurogenèse) acquièrent cette tâche aussi vite et aussi bien que leurs témoins. En revanche, lorsque le contexte reste le même mais que la zone change, les souris irradiées présentent un déficit de flexibilité cognitive, apprenant plus difficilement la nouvelle zone et se révélant incapables de « désapprendre » l'ancienne zone. Les auteurs concluent que la neurogenèse chez l'adulte joue un rôle dans la capacité à changer une réponse apprise. Cependant, l'irradiation aux rayons X de l'hippocampe est susceptible d'affecter aussi la capacité d'angiogenèse du réseau vasculaire hippocampique des souris adultes, le déficit de flexibilité cognitive observé peut ainsi être dû à un déficit d'angiogenèse et pas uniquement de neurogenèse. Cela est vrai aussi dans notre étude ; à l'heure actuelle nous ne pouvons déterminer si l'amélioration des performances en début de reversal est due à un effet du VEGF sur la neurogenèse ou sur l'angiogenèse hippocampique. Si les outils que nous avons développés (ONAS et virus dirigés contre Ang-2) ciblant en théorie uniquement le compartiment vasculaire s'avèrent efficaces, les utiliser pourrait apporter un éclaircissement à cette question.

Discussion Générale

Discussion Générale

I. Synthèse des principaux résultats et perspectives

Repartons de la figure 40 (page 61) présentée dans la discussion regroupant les différents résultats de nos études corrélatives. Nous avons vu, dans le chapitre « **étude corrélative : réactivité vasculaire** » que les artères cérébrales antérieures (ACA) et postérieures (ACP) semblent modifier leur réactivité pour permettre l'expression du souvenir. Lorsque les vaisseaux sont prélevés et maintenus *ex vivo* immédiatement après le rappel de la mémoire olfactive associative récente ou ancienne, nous détectons des modifications nettes de la signalisation calcique de ces derniers par rapport à ceux des rats témoins lorsque les vaisseaux irriguent une région impliquée dans le rappel de la mémoire récente ou ancienne. La part de cet effet due au rappel de l'information par rapport à celle due à son « stockage » n'a pas été évaluée, nous n'avons pas cherché à dissocier ces deux processus. De plus, nous ne pouvons pour l'heure interpréter à partir des modifications *ex vivo* le comportement *in vivo* des vaisseaux (une expérience a été lancée dans cet objectif, voir page 41). Mitschelen et al. (2009) ont montré chez le rat âgé que des déficits de mémoire spatiale sont corrélés à une perfusion de base augmentée au sein de l'hippocampe, mettant ainsi en évidence un lien entre dynamique vasculaire et performances mnésiques. Leur travail ne nous renseigne cependant pas sur les modifications de réactivité vasculaire accompagnant l'épreuve mnésique. A notre connaissance, notre étude est la première à rapporter des changements de réactivité vasculaire des artères cérébrales dans le cadre d'un processus mnésique.

En stimulant spécifiquement les neurones ou les vaisseaux sur tranches corticales, Rancillac et al. (2012) ont montré que les perturbations du couplage neurovasculaire se produisant sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer seraient d'origine neuronale plutôt que purement vasculaire. Notre étude fait une part plus belle aux vaisseaux sanguins : nous y mettons en évidence des modifications purement vasculaires susceptibles d'avoir affecté le mécanisme d'hyperhémie fonctionnelle. Savoir si elles ne sont qu'une conséquence de l'activité neuronale induite par l'encodage, la consolidation et le rappel du souvenir ou si ces modifications sont fonctionnellement impliquées dans le processus de consolidation mnésique reste pour l'heure une question ouverte.

Le chapitre « **étude corrélative : architecture vasculaire** » montre que les changements de structure vasculaire suivent une toute autre dynamique, soulignant ainsi une dissociation fonctionnelle entre dynamique et structure vasculaire. Il semble que la densité vasculaire ainsi que la densité d'embranchements de vaisseaux sanguins augmentent à J1 chez les rats venant d'encoder une nouvelle mémoire olfactive associative, mais que cette augmentation ne se maintient pas dans le temps : ces paramètres reviennent au niveau des rats témoins à J30. Il s'agira de compléter encore

les groupes de rats afin que les tests statistiques fassent ressortir de façon convaincante ces effets ; pour l'instant on peut seulement affirmer qu'une augmentation de densité d'embranchements vasculaires à J1 a lieu dans l'hippocampe dorsal et le cortex cingulaire antérieur (le seuil statistique étant presque atteint aussi dans le cortex orbitofrontal). L'idée d'une angiogenèse corticale précoce est de plus appuyée par notre expérience visant à révéler la prolifération de cellules vasculaires dans ces mêmes régions. Des cellules prolifèrent entre J0 et J3, et les marquages plaident bien pour une prolifération cellulaire plus importante chez les rats expérimentaux que chez les témoins dans nos régions corticales d'intérêt, le cortex orbitofrontal et le cortex cingulaire antérieur. Les cellules proliférantes apparaissent parfois dans des zones dénuées de neurones et sont pour certaines d'entre elles localisées dans la paroi des vaisseaux (doublement marquées BrdU/Collagène IV). L'analyse des marquages reste à compléter avec les régions CA2 et CA3 de l'hippocampe dorsal, et à optimiser afin d'éviter les artefacts de comptage. Le même protocole appliqué à des rats euthanasiés à J30 nous permettra de plus d'évaluer le pourcentage de néo-vaisseaux se maintenant dans le temps, et de savoir ainsi si la baisse de densité vasculaire entre J1 et J30 reflète la régression des vaisseaux nouvellement créés ou celle d'autres capillaires sanguins plus anciens. Enfin, l'expérience de qPCR visant à déterminer à J1 (sans rappel) le niveau d'expression d'ARNm de différents marqueurs classiques de l'angiogenèse est en cours de complétion, la même expérience pourra de plus être menée à un délai plus court (1h après l'interaction) pour révéler l'éventuelle présence d'un signal hypoxique.

Ainsi, nos travaux appuient l'idée qu'une angiogenèse peut bien avoir lieu au sein du cerveau adulte sain en-dehors des niches neuroangiogéniques hippocampiques. Cela fait suite à l'étude de Black et al. (1987) montrant qu'une angiogenèse corticale a lieu chez le rat adulte dans un contexte de milieu enrichi, à l'hypothèse d'une neuroangiogenèse corticale se maintenant tout au long de la vie avancée par Ambrose (2012) et aux travaux de Harb et al. (2013) mettant en évidence un remodelage vasculaire structurel chez la souris à l'aide d'une technique d'imagerie biphotonique *in vivo*. A la différence de cette dernière étude soulignant la capacité des capillaires sanguins cérébraux chez l'adulte à établir de nouveaux embranchements grâce à la seule action d'une « tip cell » sans prolifération cellulaire, nous montrons pour notre part que des cellules endothéliales prolifèrent au sein de nos régions corticales d'intérêt dans les premiers jours suivant l'interaction sociale de la tâche de TSPA. A notre connaissance, seule l'étude de Kerr et al. (2010) suggère un rôle de l'angiogenèse cérébrale dans un test mnésique, la piscine de Morris (plus particulièrement dans l'acquisition de la tâche et dans le rappel de la mémoire ancienne), cependant nous avons vu qu'elle était très critiquable, de plus le mode d'injection systémique choisi ne

permettait pas d'étudier le rôle de l'angiogenèse région par région (voir l'introduction générale, partie II.3). Nous sommes les premiers à mettre en évidence une angiogenèse précoce se mettant en place en début de consolidation mnésique dans l'hippocampe dorsal et dans des régions corticales ne prenant en charge la mémoire ancienne que plusieurs semaines plus tard.

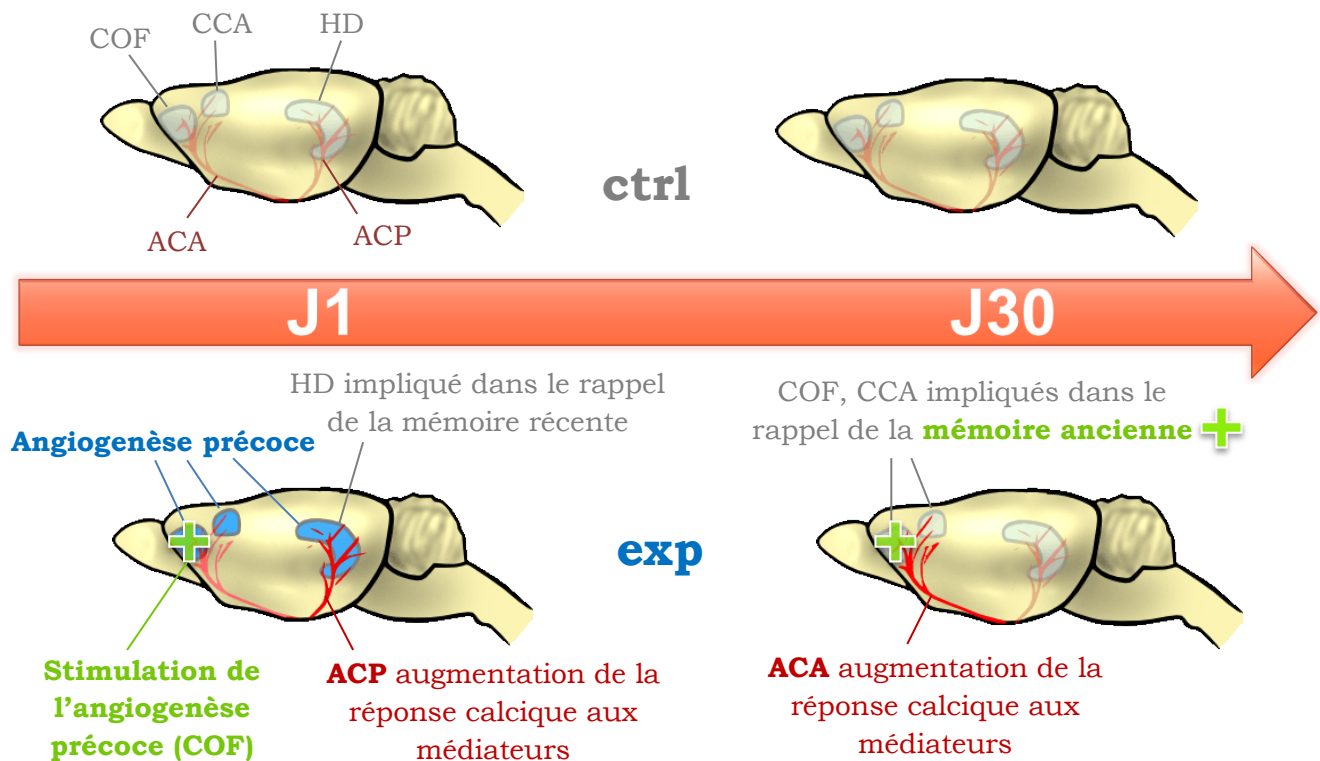


Figure 88 : Schéma faisant la synthèse des principaux résultats. Les modifications (exp versus ctrl) de signalisation calcique des artères cérébrales au cours de la consolidation mnésique apparaissent en rouge, celles de densité d'embranchements vasculaires apparaissent en bleu. Enfin, lorsque l'on stimule l'angiogenèse précoce au sein du cortex orbitofrontal, la densité de vaisseaux et d'embranchements vasculaires y reste augmentée à J30, et la mémoire ancienne est améliorée (en vert).

Le chapitre « **approche invasive : modulation de l'angiogenèse** » vise à déterminer si l'angiogenèse précoce corticale est fonctionnellement impliquée dans la consolidation mnésique, en testant si la modulation positive ou négative de ce phénomène peut affecter les performances de mémoire ancienne. Nous nous sommes concentrés sur les régions corticales (jusqu'ici majoritairement le cortex orbitofrontal), sans approfondir la piste de l'angiogenèse précoce hippocampique. Nous montrons que stimuler l'angiogenèse au sein du cortex orbitofrontal entre J0 et J6 (à l'aide d'injections d'Ang-2 exogène) conduit à l'amélioration des performances de mémoire ancienne – **quelques rats supplémentaires seront nécessaires pour passer le seuil statistique dont on est maintenant très proche** ($p=0,052$). Cette expérience est à notre connaissance la première à montrer une amélioration des performances mnésiques sur des animaux

adultes sains suite à une action ciblant le réseau vasculaire : jusqu'ici, de telles améliorations étaient obtenues sur des modèles de pathologies par injection de VEGF (Wang et al., 2011 ; Religa et al., 2013) ou en stimulant son expression et celle de VEGFR-2 (Xiong et al., 2011 ; Zhang et al., 2012).

Nos expériences visant à bloquer l'angiogenèse ont été plus laborieuses, mais les résultats négatifs peuvent trouver une explication. Au cours de cette thèse, des outils visant à cibler spécifiquement l'angiogenèse sans affecter le compartiment neuronal ont été développés (les médicaments qui auraient pu répondre à cette question étant actuellement encore en phases d'essais cliniques) : AAVs exprimant un shRNA anti-Ang-2, ONAS dirigés contre Ang-2. Nous avons commencé à tester leurs effets dans la tâche de TSPA, en ciblant maintenant préférentiellement le cortex cingulaire antérieur, où le phénomène d'angiogenèse apparaît de façon plus nette que dans le cortex orbitofrontal. **Les résultats préliminaires des expériences recourant à l'utilisation des AAVs et des ONAS (en concentration adéquate) seront obtenus prochainement. Une étape de validation de ces outils par Western-Blot pour vérifier qu'ils bloquent bien la synthèse d'Ang-2 sera réalisée.**

Les injections d'Ang-2 exogène en début de consolidation mnésique montrent que le réseau vasculaire « de base » n'est pas optimal pour la consolidation et/ou le rappel à J30 de la mémoire induite par la tâche de TSPA. Au contraire, le chapitre « **un principe généralisable ?** » montre que le réseau vasculaire initial est déjà optimal pour la réalisation d'une tâche simple et rapidement acquise de reconnaissance de nouvelle position d'objet, ainsi que pour le début de l'acquisition d'une tâche de labyrinthe radiaire, plus complexe et requérant des jours d'apprentissage. Il ne suffit pas de le densifier par injection de VEGF pour améliorer la performance mnésique au test de reconnaissance de nouvelle position d'objet, ni pour augmenter la vitesse d'acquisition de la tâche de labyrinthe radiaire (du moins lorsque 6 essais consécutifs sont réalisés par jour pour chaque rat). Cela rejoint l'étude de Licht et al. (2011) montrant qu'il est possible d'induire durablement un développement du réseau vasculaire hippocampique sans que les souris ne présentent pour autant des performances mnésiques améliorées dans un test de peur conditionnée.

Enfin, nous montrons qu'il est possible d'améliorer la flexibilité cognitive de rats grâce à des injections de VEGF, cet effet reposant sur la neurogenèse ou l'angiogenèse. Dans leur ensemble, nos travaux présentent d'ailleurs une mise en garde pour les chercheurs travaillant sur la neurogenèse : bien souvent, les méthodes employées (irradiation aux rayons X, utilisation d'un inhibiteur mitotique) peuvent agir sur ces deux phénomènes. Or considérer que l'angiogenèse cérébrale n'existe pas chez l'adulte est une erreur.

Ainsi, certaines conclusions sur le rôle de la neurogenèse sont peut-être hâtives, il faudrait toujours s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un effet de l'angiogenèse cérébrale qui n'est généralement pas prise en compte.

Les expériences qui seront réalisées à court terme afin de faire de ce travail un ensemble cohérent et complet sont indiquées ci-dessus en orange. Ce projet initialement très exploratoire, et nécessitant le développement d'outils était certainement ambitieux dans le cadre d'une thèse, c'est pourquoi il sera poursuivi après ma soutenance, sur la base des résultats exposés dans ce manuscrit.

Nous souhaitons investiguer une question supplémentaire : quel rôle joue cette angiogenèse précoce, quel lien entre néo-vaisseaux et performances mnésiques ? Rappelons quelques données déjà exposées dans la discussion du second chapitre de résultats, concernant les épines dendritiques.

Dans la tâche de TSPA, dès J1, Lesburguères et al. (2011) ont observé une augmentation du nombre d'épines dendritiques sur les neurones du cortex orbitofrontal de rats expérimentaux par rapport aux témoins. Whiteus et al. (2014) montrent que des déficits vasculaires durables occasionnés lors de la période néonatale et se traduisant par une diminution de la densité vasculaire dans certaines aires corticales réduisent la capacité de celles-ci à faire face à des conditions hypoxiques. Une réduction d'oxygène maintenue durant 48h conduit en effet à la perte d'épines dendritiques se trouvant à plus de 20µm du plus proche capillaire sanguin chez les souris présentant ces déficits vasculaires, et pas chez les souris témoins. Cela souligne l'importance de la microvasculature dans le maintien des épines dendritiques en conditions hypoxiques (et donc aussi lors de fortes demandes métaboliques). On peut alors émettre *l'hypothèse que la création de nouvelles épines dendritiques (se mettant en place dès les premiers jours de la consolidation mnésique) requiert des ajustements vasculaires locaux permettant d'adapter la distribution de l'oxygène à un réseau neuronal complexifié, suppléant ainsi à une plus forte demande métabolique*. Cela est illustré sur la figure 89 en page suivante. L'augmentation du nombre d'épines dendritiques ne représente sans doute qu'une facette des changements architecturaux survenant au sein des réseaux neuronaux corticaux qui vont sous-tendre la mémoire ancienne : on peut aussi envisager que des modifications de morphologie d'épines existantes ou la mise en fonctionnement d'épines jusque-là « silencieuses » contribuent aussi au remodelage des synapses (Segal, 2005).

Nos méthodes invasives permettront de vérifier cette hypothèse : bloquer l'angiogenèse devrait dès lors conduire à une diminution de la densité d'épines dendritiques corticales

à J30, la stimuler devrait faciliter leur mise en place. La formation de nouvelles épines dendritiques corticales s'avérant indispensable à la formation de la mémoire ancienne (Vetere et al., 2011), cela permettrait de faire élégamment le lien entre création de nouveaux capillaires sanguins, complexification du réseau neuronal cortical et performances mnésiques à J30, délai auquel la mémoire ancienne repose sur ce réseau neuronal cortical complexifié.

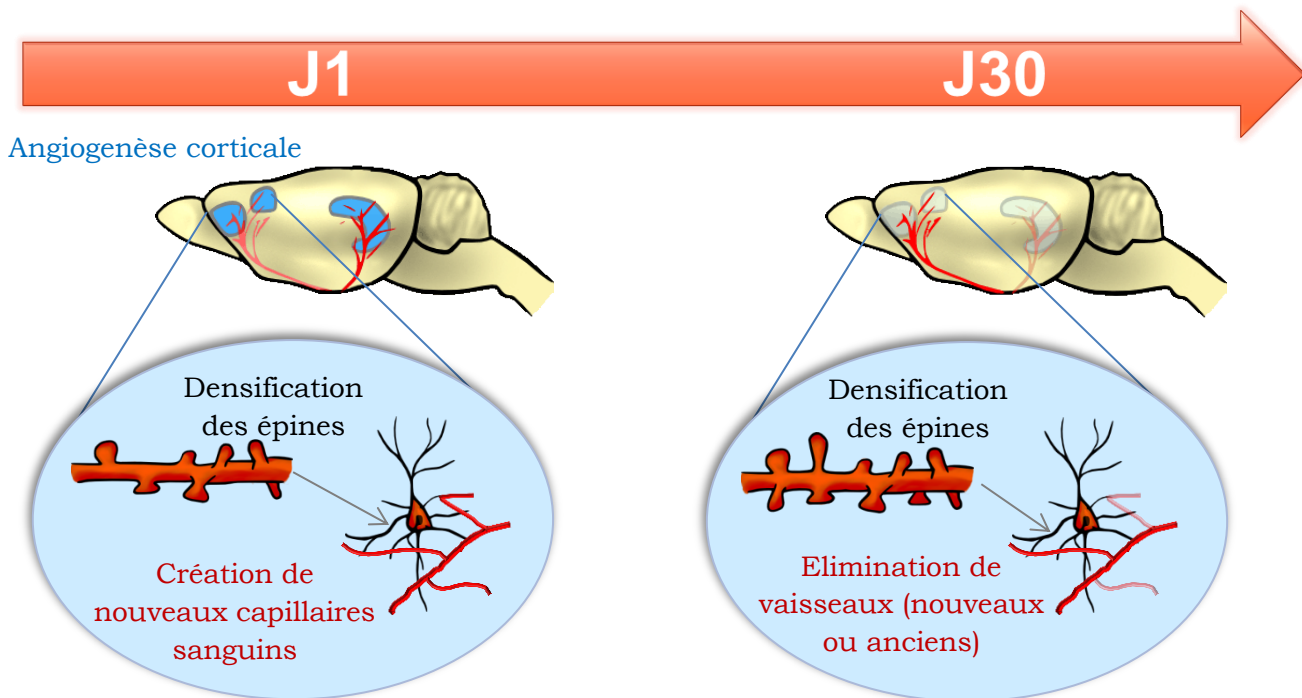


Figure 89 : Angiogenèse et épines. Dès J1, la densité d'épines dendritiques corticales (au moins dans le cortex orbitofrontal) augmente chez des rats ayant encodé à J0 une nouvelle mémoire olfactive associative. Elle continue d'augmenter entre J1 et J30 (Lesburguères et al., 2011). Parallèlement à cela, de nouveaux capillaires sanguins sont créés par angiogenèse en début de consolidation mnésique, ce qui pourrait constituer un mécanisme permissif à l'origine de la régulation des épines dendritiques. On ne sait pas encore si ces néo-vaisseaux se maintiennent ou non : on pourrait imaginer que les capillaires nouvellement créés, bien localisés par rapport aux zones de synaptogenèse, persistent pendant que d'anciens moins bien placés régressent entre J1 et J30.

Ces expériences réalisables seront démarrées prochainement. La technique d'imagerie sur tranches de neurones corticaux après injection de Luciférase Yellow au sein de leur cytoplasme, puis de comptage d'épines dendritiques, est en cours de validation dans l'équipe.

II. Au-delà du choix des régions ciblées

Au début de ma thèse, nous avons choisi de nous concentrer sur 3 régions cérébrales : hippocampe dorsal (HD), cortex orbitofrontal (COF) et cortex cingulaire antérieur (CCA). L'étude invasive, quant à elle, a restreint le champ d'étude essentiellement au COF (et plus tardivement au CCA). Cette partie vise à remettre en contexte ces structures, en présentant d'autres régions cérébrales impliquées (ou possiblement impliquées) dans le stockage et le rappel de la mémoire induite par la tâche de TSPA, suivant des cinétiques différentes. Il ne faut donc pas voir cette partie comme un regret concernant des régions cérébrales que nous aurions dû étudier aussi, puisque des choix devaient être faits – son objectif est de clarifier le rôle de toutes ces régions cérébrales dans la consolidation de la mémoire olfactive associative induite par la tâche de TSPA.

Cortex orbitofrontal et cortex cingulaire antérieur : des régions à forte capacité intégrative, impliquées dans le stockage de la trace mnésique ancienne

Le COF et le CCA ont constitué les régions privilégiées de ma thèse. Comme précisé dans l'introduction générale (partie I.4), le cortex cingulaire antérieur est impliqué dans la prise en charge de mémoires anciennes de natures variées dans des tâches spatiales ou non, aversives ou appétitives (Bontempi et al., 1999 ; Takehara et al., 2003 ; Frankland et al., 2004 ; Texeira et al., 2006 ; Weible, 2013), laissant penser qu'il agit de façon générique comme une structure intégratrice coordonnant le rappel à long terme de mémoires reposant sur des réseaux neuronaux corticaux distribués. Le cortex orbitofrontal reçoit des afférences d'aires primaires gustatives, visuelles et olfactives, entre autres du cortex piriforme (Price, 2007), et est essentiel pour la formation d'associations reposant sur une composante olfactive (Whishaw et al., 1992 ; Critchley and Rolls, 1996 ; Lipton et al., 1999), ce qui peut expliquer son recrutement dans la tâche de TSPA. Ces deux structures cérébrales, bien qu'étiquetées dès l'acquisition, ne sont pas assez « matures » pour assurer le rappel de la mémoire récente (testée à J1). Un dialogue entre ces régions et l'hippocampe est nécessaire au renforcement progressif des connexions entre neurones du COF, du CCA et d'autres régions cérébrales distribuées, dépositaires d'éléments de la trace mnésique. Il semble ainsi que le COF et le CCA servent plus à mettre en relation divers éléments présents lors de l'interaction sociale qu'à encoder ou stocker les aspects sensoriels et perceptifs de l'événement.

L'angiogenèse au sein de ces deux régions nous a particulièrement intéressés, car elle était détectable bien avant que celles-ci ne soient impliquées dans le rappel de la mémoire ancienne. Pour autant, ce déclenchement précoce n'a rien de très surprenant, les réseaux neuronaux corticaux impliqués dans l'encodage de la nouvelle mémoire

olfactive associative étant déjà étiquetés, et l'augmentation d'épines dendritiques étant détectable aussi dès J1 au sein du COF et du CCA.

Au terme de notre étude, il apparaît que l'angiogenèse se développe plus massivement au sein du CCA que du COF (statistiques de densité d'embranchements vasculaires, marquages BrdU, résultats de qPCR), faisant du CCA une région à cibler en priorité si l'on veut déterminer l'implication fonctionnelle de ce phénomène. Tous nos résultats actuels reposent cependant sur une modulation de l'angiogenèse au sein du COF, choisi comme nous l'avons déjà précisé comme région cible par défaut, sur la base des travaux d'Edith Lesburguères. Les expériences lancées plus tard, suite aux résultats préliminaires de qPCR, ciblent maintenant le CCA.

Encodage de l'odeur : que se passe-t-il au sein du cortex piriforme ?

Les premières étapes du traitement olfactif sont assurées au niveau des bulbes olfactifs et du cortex piriforme, ces régions participant aux circuits sous-tendant les mémoires de nature olfactive (Haberly and Bower, 1989 ; Calu et al., 2007 ; Cohen-Matsliah et al., 2009). Il semble raisonnable de penser que le cortex piriforme soit impliqué dans l'encodage de l'odeur lors de l'interaction sociale, il jouerait alors un rôle dans la mémoire aussi bien récente qu'ancienne. Nous n'avons pas étudié cette région, cependant elle apparaissait sur des coupes où nous avons effectué le marquage BrdU, et il semble clair qu'une angiogenèse précoce s'y déroule aussi chez les rats expérimentaux entre J0 et J3 (vu qualitativement, mais pas étudié quantitativement). Notre étude ne pouvait bien sûr pas être exhaustive, mais cette région offre un intérêt en présentant certainement une cinétique d'activation lors de la consolidation de la mémoire acquise dans la TSPA différente de l'HD, du COF et du CCA.

Le cortex piriforme pose d'ailleurs un problème concernant nos données d'imagerie calcique sur vaisseaux isolés : en effet, il est irrigué par les ACA et les artères cérébrales moyennes (non analysées). Ainsi, bien que nous ne l'ayons pas pris en considération, l'activité neuronale qui s'y joue est susceptible d'avoir influencé la réponse des ACA. En particulier, le léger effet à J1 (et une part de l'effet à J30) pourrait lui être dû.

Le rôle du cortex préfrontal médian (CPFm) dans la consolidation mnésique de la mémoire induite par la TSPA

Le CPFm n'est pas requis pour le rappel d'informations à très court terme (immédiatement après l'interaction sociale, alors qu'on peut s'attendre à ce que le cortex piriforme soit requis à un tel délai) mais est impliqué dès J1 dans le rappel de la mémoire récente, et l'est toujours à J30 dans le rappel de la mémoire ancienne (thèse

d'Edith Lesburguères). Il présente ainsi une cinétique d'activation très particulière, différente de celle de toutes les autres régions dont nous avons parlé jusqu'alors.

Edith Lesburguères émet l'hypothèse que le CPFm prend plus tardivement que l'hippocampe son rôle d'orchestrateur de la formation de mémoires anciennes, assurant en fin de consolidation mnésique des réactivations cortico-corticales permettant la fin de la maturation du réseau neuronal cortical sous-tendant la trace mnésique ancienne. Selon cette hypothèse, l'hippocampe se désengagerait une fois que le CPFm serait en mesure d'assurer ce rôle et de permettre le rappel unifié de la mémoire ancienne reposant sur des réseaux corticaux distribués. Cela semble plausible au vu de la connectivité du CPFm, idéale pour intégrer une information distribuée dans de nombreuses régions corticales (Blum et al., 2006). En particulier, le CPFm présente des connexions réciproques avec le COF et le cortex piriforme (Conde et al., 1995). De plus, de nombreuses connexions réciproques entre la région hippocampique et le CPFm existent (Burwell and Amaral, 1998 ; Vertes, 2006).

Hippocampe : quel rôle y joue l'angiogenèse précoce ?

Comme spécifié dans l'introduction générale (partie I.3), l'hippocampe apparaît comme l'orchestrateur du dialogue hippocampo-cortical, induisant des changements graduels de l'organisation des réseaux neuronaux corticaux (Squire et Alvarez, 1995). Nous avons montré que l'hippocampe dorsal semble aussi être le théâtre d'une angiogenèse précoce (à confirmer par une analyse des marquages BrdU au niveau des régions CA2 et CA3 de l'hippocampe). Cependant, nos travaux se sont concentrés sur l'angiogenèse corticale précoce, dans des régions sous-tendant la trace mnésique ancienne, consolidée. Dans ces régions, le lien entre création de nouvelles épines dendritiques, complexification progressive du réseau neuronal et angiogenèse est très envisageable ; au contraire, dans l'hippocampe qui se désengage, il est plus difficile d'y appréhender un rôle fonctionnel de l'angiogenèse précoce.

Plusieurs travaux rapportent une augmentation de la densité d'épines dendritiques hippocampiques lors de la formation de la mémoire (Leuner et al., 2003 ; Knafo et al., 2004 ; Restivo et al., 2006), ainsi que dans le cadre de la consolidation d'une mémoire de peur contextuelle (Restivo et al., 2009). Cette dernière étude révèle que le rappel de la mémoire récente s'accompagne d'une augmentation de la densité d'épines dendritiques dans l'hippocampe (et le rappel de la mémoire ancienne d'une augmentation d'épines dendritiques dans le cortex cingulaire antérieur). Ainsi, les régions corticales prenant en charge la mémoire ancienne, théâtres d'une complexification du réseau neuronal sous-tendant la trace mnésique ancienne stabilisée, ne sont pas les seules régions où se déroule une augmentation de la densité

d'épines dendritiques : c'est aussi le cas dans l'hippocampe, au moins au début du processus de consolidation mnésique. La création d'épines dendritiques pourrait d'ailleurs être un phénomène instable et transitoire dans l'hippocampe (Segal, 2005 ; De Roo et al., 2008).

Il sera très intéressant de comparer la persistance à J30 des vaisseaux créés entre J0 et J3 (expérience en cours, décrite dans la discussion du 2^{ème} chapitre de résultats). On pourrait émettre l'hypothèse qu'ils persistent plus dans le cas du COF et du CCA, où les nouvelles épines dendritiques du réseau neuronal sous-tendant la trace mnésique ancienne doivent être maintenues, que dans le cas de l'HD, désengagé en fin de consolidation mnésique.

Schéma récapitulatif

Les implications (démonstrées ou probables) de ces différentes régions dans le processus de consolidation mnésique sont synthétisées sur la figure 90.

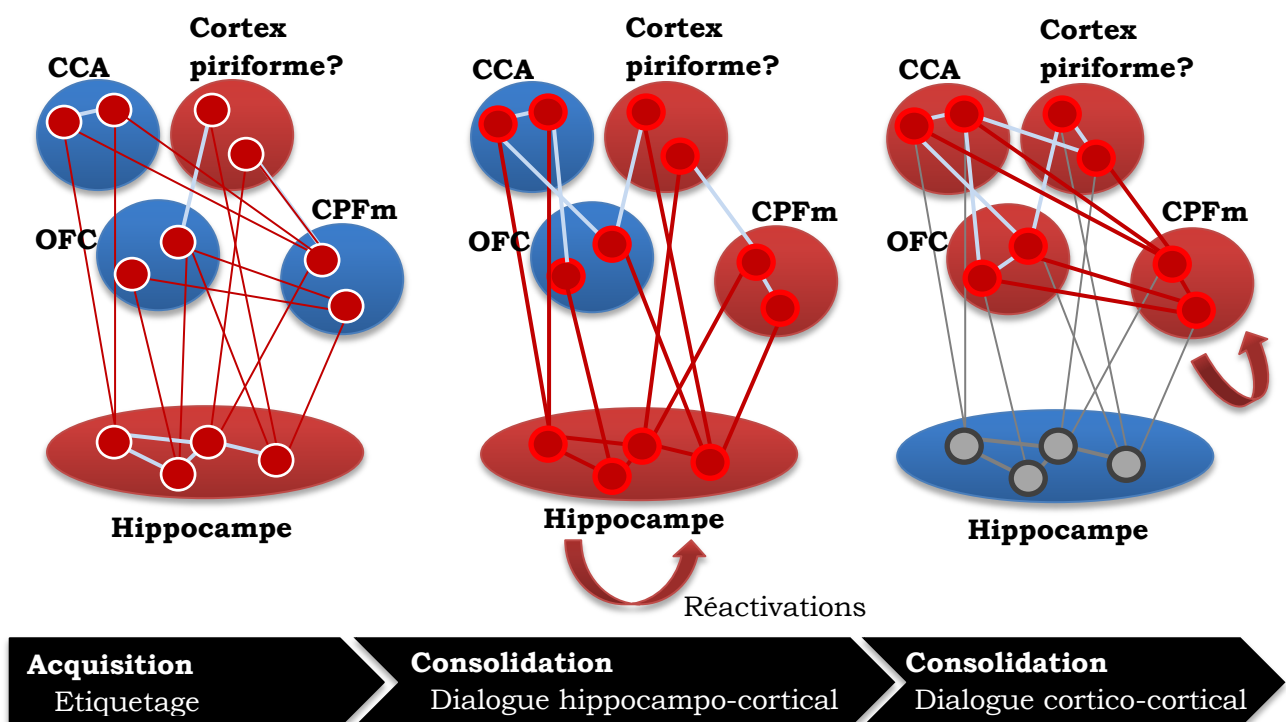


Figure 90 : Immédiatement après l'acquisition, l'hippocampe et des régions corticales permettant l'encodage de l'odeur (le cortex piriforme est susceptible d'en faire partie) sont impliqués dans le rappel. Plus tard, à J1, le CPFm devient aussi impliqué dans le rappel de la mémoire récente alors qu'il ne l'était pas à très court terme. Plusieurs semaines sont nécessaires avant que le CCA et l'OFC soient impliqués dans le rappel de la mémoire ancienne. L'hippocampe est alors désengagé. Le rôle du CPFm dans la maturation cortico-corticale, une fois l'hippocampe désengagé, reste une hypothèse. Les régions impliquées dans le rappel à très court terme (à gauche), à court terme (au milieu) et dans le rappel de mémoire ancienne (à droite) apparaissent en rouge. Les ronds rouges représentent des assemblées neuronales impliquées dans l'encodage, la rétention et le rappel de l'information. D'après la thèse d'Edith Lesburguères.

Remettons ces différentes régions à leur place (figure 91) :

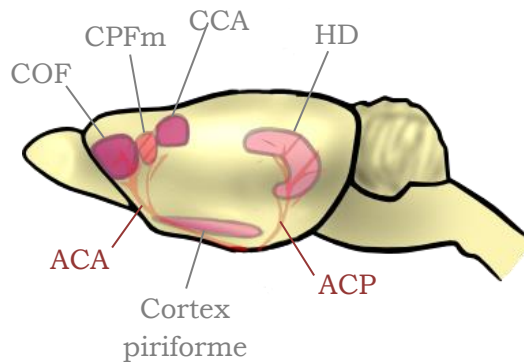


Figure 91 : Localisation du CCA, du COF, de l'HD, du CPFm et du cortex piriforme, ainsi que des ACA et des ACP.

Dans nos données de **réactivité calcique**, il est possible qu'une part de l'effet à J30 et le léger effet à J1 observés pour les ACA soient dus au cortex piriforme (en partie irrigué par les ACA) et au cortex préfrontal médian (irrigué par les ACA).

Une **angiogenèse précoce** a été mise en évidence dans le CCA, dans le COF et dans l'HD (des données complémentaires étant nécessaires pour pouvoir l'affirmer dans ces deux dernières régions). Il semble qu'elle ait aussi lieu au sein du cortex piriforme, au vu d'images de marquages BrdU (non analysés de façon systématique). L'angiogenèse au sein du CPFm resterait à explorer. Enfin, il sera intéressant de comparer la persistance à J30 des vaisseaux nouvellement créés entre J0 et J3 au sein de ces différentes régions. En particulier, il est possible qu'ils soient moins persistants au sein de l'hippocampe dorsal qu'au sein des régions corticales sous-tendant la trace mnésique ancienne.

III. Contrôler l'interaction

Une limite de la tâche de TSPA est le fait qu'on ne contrôle pas précisément la quantité d'information échangée durant l'interaction sociale, quantité qui peut varier d'un rat observateur à l'autre et ainsi expliquer certaines disparités dans les performances mnésiques. Contrôler l'interaction est encore plus essentiel lorsque les rats reçoivent un traitement au préalable : les rats recevant avant l'interaction des AAVs exprimant un shRNA anti-Ang-2 ou des ONAS anti-Ang-2 vont-ils encoder la même quantité d'information que les témoins au cours de l'interaction ? Partant de ce constat, nous avons développé un protocole permettant le suivi des rats par video-tracking (système Noldus) durant l'interaction, dans le but de déterminer les paramètres importants de l'interaction sociale (nombre de contacts entre démonstrateurs et observateurs, durée totale des contacts, « qualité » des contacts).

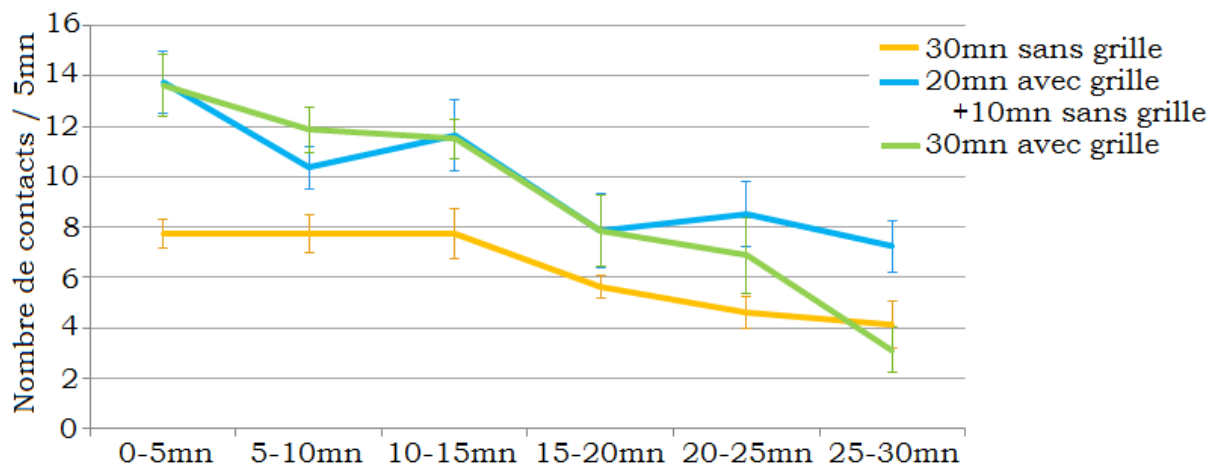


Figure 92 : Nombre de contacts nez-nez entre observateur et démonstrateur par blocs de 5 minutes pendant l'interaction sociale. Les rats interagissent sans grille (courbe jaune), ou au travers d'une grille (courbe verte), ou au travers d'une grille les 20 premières minutes puis sans grille les 10 dernières (courbe bleue). n=8 rats par groupe.

La figure 92 ci-dessus illustre les variations du nombre de contacts au cours de l'interaction. Elle montre que lorsque les rats sont contraints d'interagir au travers d'une grille, il y a globalement plus de contacts nez-nez que lorsqu'ils sont libres de se déplacer tous deux dans la cage entière, et donc d'interagir de diverses façons, pouvant se renifler tout le corps ou se battre. Cela justifie l'utilisation initiale de la grille.

On remarque aussi qu'une grille laissée de façon prolongée n'est plus efficace au bout d'un certain temps : le nombre de contacts diminue progressivement (courbe verte). Au contraire, si l'on enlève la grille pour les 10 dernières minutes (courbe bleue), on stimule à nouveau l'intérêt des rats, permettant un nombre de contacts plus élevé que

lorsque la grille reste en place les 10 dernières minutes. La courbe bleue correspond au protocole que nous avons classiquement utilisé dans cette thèse.

Cette courbe justifie aussi l'astuce comportementale à laquelle nous avons eu recours avant les injections répétées d'Ang-2/aCSF au sein du COF (chapitre d'expériences invasives, partie IV.1). Nous avons alors laissé la grille tout du long afin d'affaiblir la trace mnésique (et pouvoir ainsi espérer l'améliorer), nous basant sur des résultats montrant que les performances à J30 des rats sont alors globalement moins bonnes qu'en suivant le protocole classique (20mn avec grille, 10mn sans grille). Cependant, de façon inattendue, les rats suivant le protocole classique d'interaction obtiennent de moins bons résultats à J60 que ceux pour lesquels la grille est laissée tout du long de l'interaction (figure 93) : avec le protocole classique, la mémoire n'est plus maintenue à J60, alors que les rats ayant interagi au travers d'une grille restent performants à ce délai.

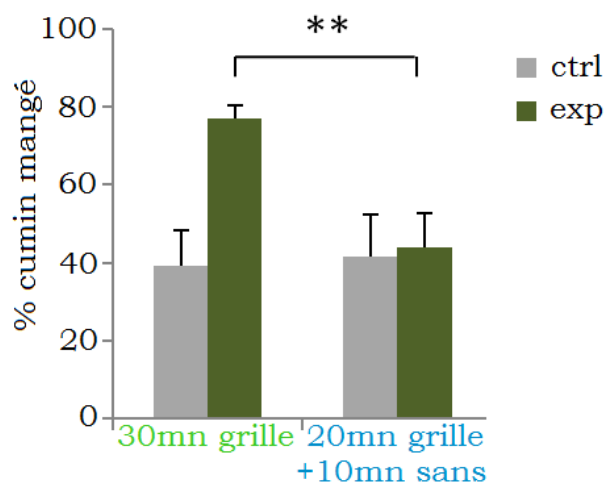


Figure 93 : Résultats au test de TSPA réalisé à J60, pour des rats ayant interagi avec un démonstrateur « plain » (ctrl) ou cumin (exp). L'interaction s'est déroulée pendant 30mn avec une grille, ou pendant 20mn avec une grille suivies de 10mn sans grille (protocole classique). n=8-9 rats par groupe ctrl, n=10-17 rats par groupe exp. ** p<0,01 t-test de Student.

Nous avons remarqué que les contacts sont plus longs lorsque la grille est laissée que lorsqu'on l'enlève (figure 94). Mais cela n'explique pas ces résultats inverses entre J30 et J60. Un autre facteur peut être pris en considération : lorsque la grille est enlevée, les rats sont très actifs et passent les 10 dernières minutes à se renifler, mais pas que le nez, contrairement à pendant la période initiale avec la grille. De plus, ils peuvent en venir à se battre. L'information encodée lors de l'interaction est ainsi polymodale, diluée au milieu d'autres informations lorsque la grille est enlevée ; lorsqu'elle est laissée en place l'information est unimodale, moins complexe, pouvant potentiellement subir un processus de sémantisation plus facilement. Cela pourrait expliquer qu'entre J30 et J60, la mémoire acquise lors d'une interaction avec grille laissée tout du long soit bien conservée, mieux qu'après une interaction induisant une mémoire plus polymodale.

Il apparaît ainsi que l'information acquise lors de l'interaction sociale n'est pas tout à fait de la même nature avec ou sans grille. Il est donc un peu abusif d'utiliser des protocoles variés et d'en comparer les résultats : par exemple, on ne peut affirmer que l'implication du COF dans la prise en charge de la mémoire ancienne est exactement la même lorsqu'on laisse la grille tout du long que lorsqu'on l'enlève sur la fin.

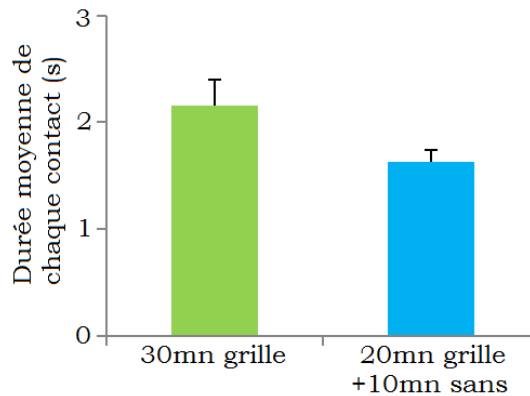


Figure 94 : Durée moyenne des contacts nez-nez lors de l'interaction sociale, avec grille tout du long ou en enlevant la grille les 10 dernières minutes. n=8 rats par groupe.

Notre volonté est de pouvoir corrélérer les performances mnésiques à J30 avec soit le nombre de contacts lors de l'interaction, soit la durée cumulée des contacts (l'expérience est en cours). Idéalement, il sera alors possible de systématiquement filmer les interactions et, à l'aide d'un logiciel nous permettant de déterminer ces paramètres en temps réel, de couper l'interaction lorsqu'ils atteignent le seuil voulu. On pourra ainsi contrôler la force de la trace mnésique en choisissant le seuil, et faire en sorte que tous les rats acquièrent bien la même quantité d'information. On s'attend ainsi à moins de variabilité dans les performances mnésiques. Un tel contrôle de la quantité d'information encodée est déjà utilisé dans d'autres tests mnésiques, par exemple dans le test de reconnaissance de nouvel objet ou de nouvelle position, mais cela n'a pas encore été mis au point et validé pour la tâche de TSPA.

Les quelques expériences décrites dans cette partie ont été réalisées avec Benjamin Bessières, aussi doctorant dans l'équipe. Ces améliorations du protocole de la tâche de TSPA feront l'objet d'une publication en cours de rédaction ; ils seront de plus présentés par Benjamin lors du prochain congrès de la Society for Neuroscience. Les futurs projets ayant recours à la tâche de TSPA bénéficieront de cette possibilité de contrôler l'interaction.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Nos travaux sont les premiers à mettre en évidence des changements vasculaires se produisant à différentes étapes du processus de consolidation mnésique, ils éclairent la contribution de la sphère vasculaire à un processus cognitif. Pour cela, nous avons utilisé un test induisant de façon durable une mémoire olfactive associative chez le rat, la transmission sociale de préférence alimentaire.

Nous avons pu montrer par imagerie *ex vivo* que la signalisation calcique des artères cérébrales est modifiée en fonction des régions cérébrales impliquées dans le rappel de la mémoire récente ou ancienne. Des médiateurs induisant une augmentation de calcium intracellulaire révèlent une plus grande réactivité calcique des ACP (irriguant principalement l'hippocampe) à J1 et des ACA (irriguant entre autres les cortex orbitofrontal et cingulaire antérieur) à J30 chez les rats expérimentaux, par rapport aux rats contrôles n'ayant pas formé de nouvelle mémoire olfactive associative. Ainsi, la dynamique de ces artères cérébrales semble s'adapter à l'expression du souvenir.

Nous avons de plus mis en évidence une augmentation de la densité d'embranchements vasculaires dès le lendemain de l'interaction sociale, aussi bien dans l'hippocampe que dans nos régions corticales d'intérêt, ces dernières ne prenant pourtant en charge le souvenir que plusieurs semaines plus tard. L'induction d'une d'angiogenèse précoce suite à l'encodage d'une nouvelle mémoire olfactive associative a été confirmée au sein du cortex cingulaire antérieur par comptage des cellules vasculaires proliférantes entre J0 et J3, le protocole de comptage est encore en cours d'optimisation avant de compléter ces données. Il semble cependant que cet effet ne perdure pas dans le temps. A J30 la densité d'embranchements vasculaires retrouve en effet le même niveau que chez les rats témoins dans toutes les régions cérébrales étudiées.

Ainsi, ces changements structuraux précoces suivent une toute autre cinétique que les changements de dynamique des artères cérébrales, mettant en évidence une dissociation fonctionnelle entre architecture et dynamique du réseau vasculaire dans le cadre d'un processus cognitif, idée qui n'avait à notre connaissance pas encore été avancée.

Afin d'établir la pertinence fonctionnelle de cette angiogenèse précoce, nous avons stimulé spécifiquement l'angiogenèse par injection d'Ang-2 exogène dans le cortex orbitofrontal suite à l'interaction sociale. Les performances des rats lors du rappel de la mémoire ancienne sont alors améliorées. Il s'agit à notre connaissance de la première expérience montrant une amélioration des performances mnésiques par une action sur le réseau vasculaire cérébral de rats adultes sains. Le réseau vasculaire semble en effet déjà optimal pour acquérir la tâche dans un test de labyrinthe radiaire (avec 6 essais

consécutifs par jour) et pour effectuer le test de reconnaissance de nouvelle position d'objet.

Des stratégies visant à bloquer spécifiquement l'angiogenèse ont de plus été développées, les premiers tests des ONAS anti-Ang-2 et des AAVs exprimant un shRNA anti-Ang-2 sont en cours, en ciblant maintenant préférentiellement le cortex cingulaire antérieur. Nous émettons l'hypothèse que cette angiogenèse précoce constitue un mécanisme permissif à l'origine de la régulation des épines dendritiques au sein du réseau neuronal cortical permettant le stockage de la mémoire ancienne et à terme sa restitution.

Pris dans leur ensemble, nos résultats mettent en évidence une certaine plasticité du réseau vasculaire accompagnant le processus de consolidation mnésique. La possibilité d'améliorer les performances de mémoire ancienne par une action sur l'angiogenèse corticale précoce suggère en outre que ce mécanisme est fonctionnellement impliqué dans la consolidation mnésique. Si les liens entre les modifications dynamiques et structurelles du réseau vasculaire et le remodelage des réseaux neuronaux sous-tendant la trace mnésique restent à explorer, notre étude appuie fortement l'intuition de Black et al. (1987), extrêmement peu reprise depuis, que la plasticité neuronale pourrait être tributaire d'une certaine plasticité vasculaire.

Toute notre étude est basée sur un seul test mnésique : la tâche de transmission sociale de préférence alimentaire (les autres tests mnésiques utilisés dans le dernier chapitre apportant des éléments de réponse à des questions différentes). Il sera intéressant de vérifier si les adaptations vasculaires observées reflètent un principe plus général : des changements de dynamique vasculaire s'adaptant à l'expression du souvenir, une angiogenèse précoce se mettant en place dans les régions sous-tendant aussi bien la mémoire récente qu'ancienne, son implication fonctionnelle dans le processus de consolidation mnésique, et enfin son lien éventuel avec la densification d'épines dendritiques. Se concentrer sur le test de TSPA présentait l'avantage de partir avec des idées claires quant à l'implication fonctionnelle de certaines régions cérébrales (HD, CCA, COF, CP), chose nécessaire pour pouvoir démarrer un projet résolument exploratoire.

En investiguant le rôle des vaisseaux sanguins cérébraux dans un processus cognitif, en cherchant à établir des ponts entre plasticité vasculaire et remodelage des réseaux neuronaux, ce projet ouvre (à très long terme car nous n'avons posé ici que quelques premières pierres) un champ d'innovations thérapeutiques encore peu exploré.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Animaux



Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles adultes de la lignée Sprague Dawley (arrivés à 250g, 300-400g au moment de réaliser l'épreuve mnésique) provenant du centre d'élevage JANVIER (Le Genest Saint Isle). Dès leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été placés en cages collectives (2 rats par cage) et ont disposé de nourriture et de boisson *ad libitum* dans une animalerie climatisée (22-23°C) équipée d'un cycle artificiel lumière-obscurité de 12 heures (7h on – 19h off). Une période d'adaptation d'une semaine à ces nouvelles conditions de vie a été respectée avant de démarrer toute procédure expérimentale (chirurgie, isolement, test mnésique...).

Les procédures utilisées ont fait l'objet d'une saisine approuvée par le comité d'éthique de Bordeaux (saisine n°50120165A).

Tests comportementaux

Le test de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA) a été très majoritairement utilisé dans ma thèse pour tester la mémoire récente ou ancienne des rats. Les tests mnésiques spatiaux de reconnaissance de nouvelle position d'objet et de labyrinthe radiaire ont été utilisés dans le dernier chapitre de résultats (« un principe généralisable ? ») afin de vérifier si un résultat obtenu avec la tâche de TSPA était généralisable à d'autres tests mnésiques (présentant une demande cognitive plus ou moins importante et requérant une phase d'apprentissage plus ou moins longue).

Transmission Sociale de Préférence Alimentaire (TSPA)

Le test de TSPA permet l'induction, au cours d'une interaction sociale unique avec un congénère, d'une mémoire olfactive associative durable. Il permet l'étude du processus de consolidation mnésique (voir l'introduction générale, partie I.4 pour plus de précisions).

Les rats sont isolés une semaine avant de commencer la restriction alimentaire (15g de nourriture/jour pour les observateurs et les démonstrateurs) 3 jours avant l'interaction. De J-3 à J-1, ils sont habitués à se nourrir dans des ramequins en porcelaine blanche (hauteur 4 cm ; diamètre 7 cm) contenant de la nourriture en poudre de même composition que les pellets habituels. Les observateurs sont exposés à 2 ramequins remplis de nourriture en poudre durant 20 minutes chacun des 3 jours d'habituation. Les démonstrateurs sont exposés durant 30 minutes à 1 ramequin contenant de la nourriture en poudre à J-3, puis à un ramequin contenant de la nourriture aromatisée

au cumin (dosée à 0,5%) à J-2 et J-1 pour les « démonstrateurs cumin » ou de la nourriture habituelle, appelée « plain », pour les « démonstrateurs plain ». Le jour de l'interaction (J0), le démonstrateur cumin consomme de la nourriture aromatisée au cumin dosée à 0,6% (figure 95A) et le démonstrateur plain de la nourriture habituelle pendant 30 minutes (figure 95D) et il est placé dans la cage d'élevage d'un rat observateur immédiatement après. Les deux rats, initialement séparés par une grille, interagissent pendant 20 minutes (figures 95B et 95C). La grille est ensuite enlevée pour les 10 dernières minutes d'interaction. L'observateur expérimental identifie dans l'haleine du démonstrateur l'odeur de la nourriture aromatisée au cumin, il encode une nouvelle mémoire olfactive associative (figure 95B). Cela n'a pas lieu chez l'observateur contrôle qui interagit avec un démonstrateur « plain » (figure 95E).

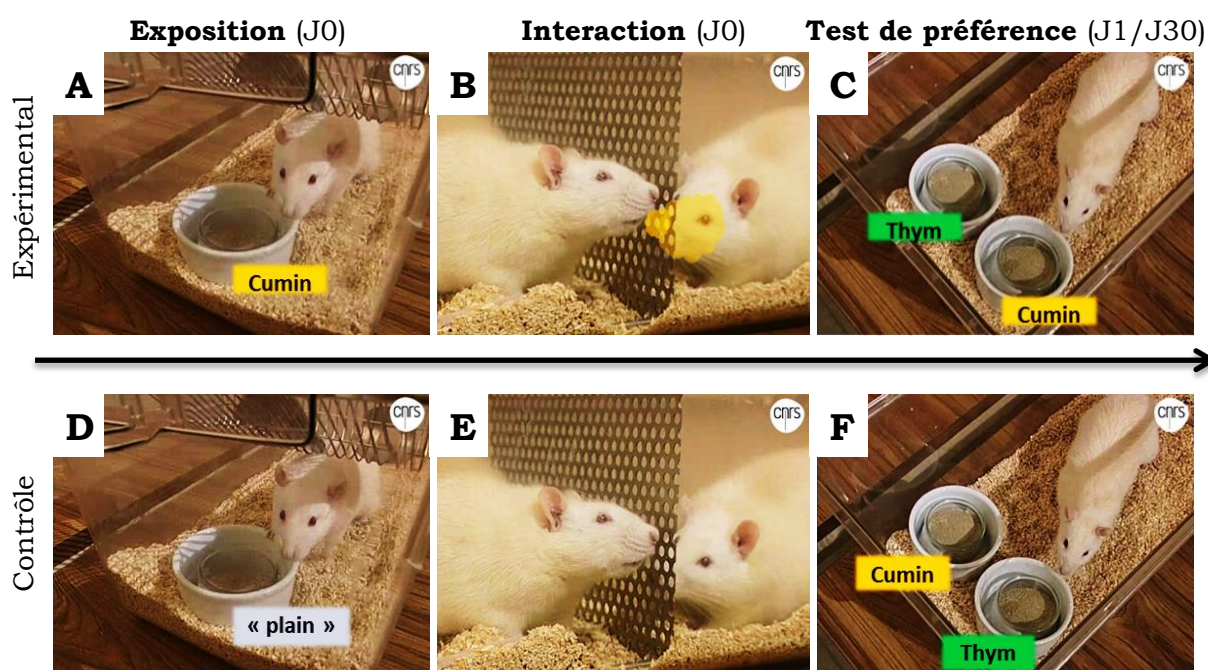


Figure 95 : Déroulé du test de TSPA. (A), (D) Les démonstrateurs sont exposés à de la nourriture aromatisée au cumin ou non avant (B), (E) l'interaction sociale avec les observateurs. (C), (F) La mémoire associative olfactive des observateurs peut ensuite être évaluée à l'aide d'un test de préférence.

Lors du test de préférence (ou rétention), le rat observateur a le choix entre deux nourritures, l'une familière parfumée au cumin (0,5%), l'autre nouvelle, parfumée au thym (0,75%) (figures 95C et 95F). Bien que préférant naturellement la nourriture parfumée au thym (environ 20% de cumin mangé par un rat contrôle), le rat expérimental exprime la mémoire de l'association en choisissant préférentiellement la nourriture parfumée au cumin qu'il considère comme « sans danger » (environ 60 à 80% de cumin mangé par un rat expérimental). Le test de préférence dure 20 minutes, au bout desquelles les ramequins sont retirés et pesés.

Le pourcentage de nourriture parfumée au cumin consommée sert d'indice de performance, il est calculé ainsi : $100 \times (\text{quantité de nourriture au cumin consommée}) / (\text{quantité totale de nourriture consommée})$. Le test de rétention peut être effectué à différents délais, nous l'avons réalisé à J1 (mémoire récente) ou à J30 (mémoire ancienne consolidée). Lorsque le test est réalisé à J30, les rats sont placés en privation alimentaire 3 jours avant (15g de pellets/jour de privation).

Reconnaissance de nouvelle position d'objet

Le test de reconnaissance de nouvelle position d'objet exploite la préférence innée des rongeurs pour la nouveauté (voir le chapitre « un principe généralisable ? », partie I.2 pour des précisions concernant son principe). Nous l'avons utilisé afin de tester chez le rat une mémoire spatiale récente et rapidement acquise.

Pour cette tâche mnésique, les rats n'ont pas été isolés et sont restés à 2 par cage. Ils subissent tout d'abord une phase d'habituation à l'arène (carré en PVC 60cm x 60cm, parois en polycarbonate transparent, fabrication par Imetronic, Pessac) et à son environnement (salle d'expérience avec des indices visuels disposés sur les murs) pendant 10 minutes chaque jour, de J-3 à J-1 (figure 96A). Les rats sont à chaque fois amenés en salle d'expérience 30 minutes avant d'être placés dans l'arène, et y restent 30 minutes une fois l'habituation terminée avant d'être ramenés à l'animalerie.

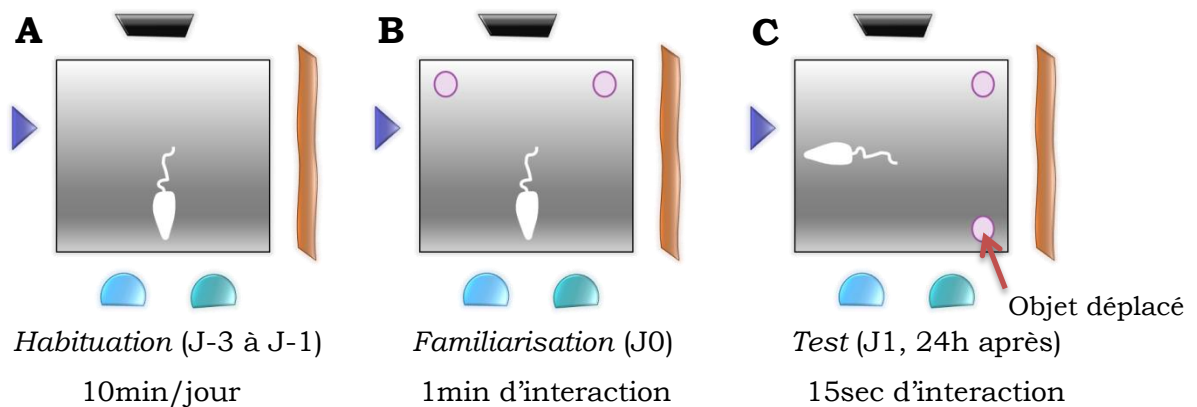


Figure 96 : Déroulé du test de reconnaissance de nouvelle position d'objet. **(A)** Le rat est habitué à l'arène avant **(B)** la phase de familiarisation. **(C)** La mémoire de reconnaissance de position est évaluée lors du test, 24h après la familiarisation.

Lors de la phase de familiarisation (figure 96B), 2 objets identiques (cylindres rouges de 12cm de diamètre) sont placés dans 2 coins de l'arène, à environ 6cm des bords, le rat étant posé dos aux objets. Le rat est filmé et repéré à l'aide d'un système de video-tracking (Noldus) permettant le repérage de son corps, et en particulier de son nez, en temps réel. L'exploration est stoppée après une minute d'interaction avec les objets (on parle d'interaction lorsque le nez du rat se trouve à moins de 5cm de l'un des objets).

La mémoire de reconnaissance de nouvelle position est testée 24 heures plus tard (figure 96C). Lors du test, l'un des objets est déplacé dans un autre coin de l'arène, le rat étant toujours déposé dos aux objets. Le temps d'interaction avec les objets est fixé à 15 secondes afin que la nouvelle position n'ait pas le temps de devenir familière. L'indice de performance correspond au pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé, il est calculé comme suit : $100 \times (\text{temps d'interaction avec l'objet déplacé}) / (\text{temps total d'interaction avec les objets} = 15 \text{ secondes})$. Ainsi, un indice de 50 correspond au niveau de hasard, le rat passant autant de temps à explorer les 2 objets.

Discrimination spatiale dans le labyrinthe radiaire

Le test de labyrinthe radiaire repose sur la capacité des rats à se repérer dans l'espace à l'aide d'indices visuels environnants. Nous l'avons utilisé pour tester la vitesse d'acquisition d'une tâche mnésique (ici, retenir les 3 bras appâtés), la mémoire à long terme (testée à 7 jours) et la flexibilité cognitive (voir le chapitre « un principe généralisable ? », partie I.3 pour plus de précisions).



Figure 97 : Le labyrinthe radiaire.

Les rats ayant participé à cette tâche, tous opérés, ont été isolés suite à l'opération (1 mois avant le début du test). Les animaux sont pesés afin d'établir leur poids de référence. S'ensuivent 4 jours de restriction alimentaire, la nourriture qui leur est donnée (toujours au même moment de la journée) est alors estimée dans l'objectif de les amener à 90% de leur poids de référence avant le premier jour d'habituation. Au cours des phases

d'habituation, de test et de reversal, les rats sont repérés à l'aide du logiciel de video-tracking fourni par Imetronic, concepteur aussi du labyrinthe radiaire pour rats que nous avons utilisé (figure 97). Cela permet le suivi de l'animal et la gestion automatique de fermeture et d'ouverture des portes.

La tâche commence avec 2 jours d'habituation. Le rat est initialement placé au centre du labyrinthe à 8 bras, toutes portes fermées. Elles s'ouvrent au bout de 30 secondes et restent ouvertes jusqu'à la fin de l'exercice, lorsque le rat a visité les 8 bras, un bras étant considéré comme visité lorsque le rat a dépassé la moitié de celui-ci. Lors du premier jour de l'habituation (figure 98A), de la nourriture (3 Choco Pops) est déposée dans chaque mangeoire en bout de bras ainsi qu'au milieu de chaque bras ; elle n'est déposée qu'au bout de chaque bras lors du deuxième jour d'habituation (figure 98B). Chaque rat réalise une seule fois l'exercice par jour, les rats explorant peu étant repassés en fin de journée jusqu'à ce qu'ils consomment les pastilles de nourriture.

Lors des 9 jours de test qui suivent (figure 98C), seuls 3 bras sont appâtés (bras 1, 2 et 4 pour le premier rat, bras 2, 3 et 5 pour le suivant, etc...). Le rat est initialement déposé au centre, toutes les portes s'ouvrent au bout de 30 secondes, les portes (à part celle du bras où il se trouve) se referment lorsque le rat visite le dernier bras appâté, et la dernière porte se ferme lorsqu'il revient au centre, complétant alors un essai. Chaque rat réalise 6 essais à la suite par jour. D'un essai à l'autre et d'un jour sur l'autre, les 3 bras appâtés restent bien sûr les mêmes pour chaque rat, afin de leur permettre de maîtriser progressivement la tâche de discrimination spatiale.

Les animaux restent ensuite une semaine à l'animalerie sans tâche particulière, toujours privés à 90% de leur poids de référence. On réalise un test en rétention 7 jours après le 9^{ème} jour de test, au cours duquel chaque rat réalise à nouveau 6 essais, les bras appâtés étant les mêmes que ceux précédemment appris (figure 98D).

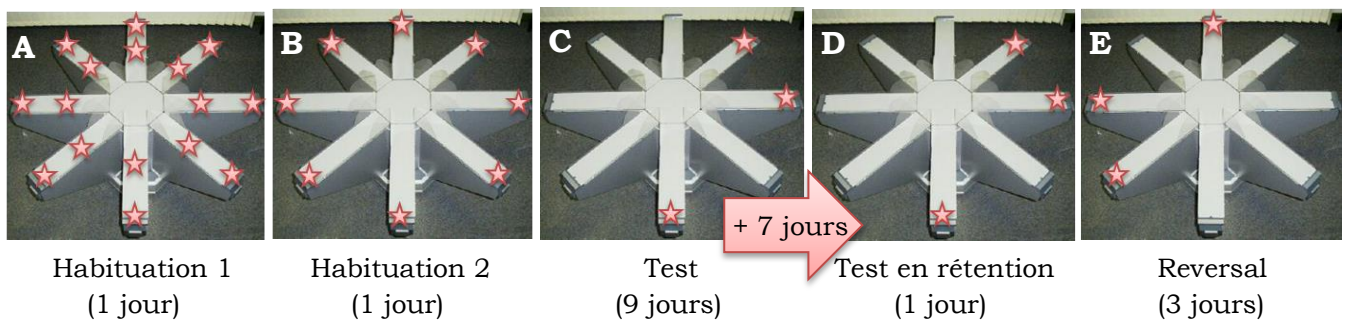


Figure 98 : Déroulé du test de labyrinthe radiaire. **(A), (B)** Le rat est habitué au labyrinthe à 8 bras, à son environnement et à aller chercher la nourriture au bout des bras. **(C)** Durant les 9 jours de test, le rat doit retenir les 3 bras appâtés. **(D)** Il est testé à nouveau 1 semaine plus tard avec ces mêmes bras appâtés, avant **(E)** 3 jours de reversal, au cours desquels le rat doit apprendre 3 nouveaux bras appâtés (les symétriques des anciens).

Le lendemain, les rats sont soumis au début du reversal (figure 98E) : les bras appâtés sont maintenant les symétriques des bras précédemment appris. Les animaux réalisent à nouveau 6 essais à la suite par jour, le reversal durant 3 jours.

Pour chaque jour de test, de test en rétention et de reversal, on compte le nombre moyen d'erreurs par essai (le retour dans un bras appâté déjà visité ou la visite d'un bras non appâté comptent pour une erreur). Nous avons de plus calculé le pourcentage de bons choix (visite d'un bras appâté) sur les 3 premiers choix effectués lors de chaque essai.

Chirurgie – implantation des guides canules

Les implantations stéréotaxiques de guides canules ont toujours été effectuées un mois avant le début des tâches mnésiques afin d'éviter les phénomènes inflammatoires observés (dernier chapitre de résultats, partie II) après une attente de seulement 2 semaines suite à la chirurgie.

Les interventions chirurgicales ont été réalisées sous anesthésie, par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (Bayer, 8 mg/kg) et de kétamine (Virbac, 100 mg/kg). Une fois endormi, l'animal est placé sur un appareil stéréotaxique (Kopf Instruments), ses yeux sont recouverts de gel oculaire (Liposic) pour éviter qu'ils ne se dessèchent. La peau du crâne est incisée longitudinalement après application d'un antiseptique (Bétadine iodée 10%), et l'os crânien est ensuite mis à nu et nettoyé. Deux vis sont fixées dans l'os crânien, elles serviront à ancrer le casque (guides canules entourés de ciment dentaire) à celui-ci. Deux guides canules (Le Guellec, longueur 8mm, diamètre extérieur 0,46mm, diamètre intérieur 0,255mm) sont implantés en bilatéral 1,5mm au-dessus des coordonnées stéréotaxiques du site d'injection choisi (voir ci-dessous celles utilisées pour nos trois structures d'injections intracérébrales, le cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire antérieur et l'hippocampe dorsal). Ils sont fixés au crâne et aux vis à l'aide de ciment dentaire (résine métacrylate). Une fois le ciment sec, la peau du crâne est recousue et un antiseptique (Bétadine iodée 10%) est appliqué au niveau de la plaie. L'animal est maintenu dans une pièce chauffée (~26°C) jusqu'à son réveil pour éviter qu'il ne soit en situation d'hypothermie suite à l'opération, puis ramené à l'animalerie pour une récupération complète pendant un mois.

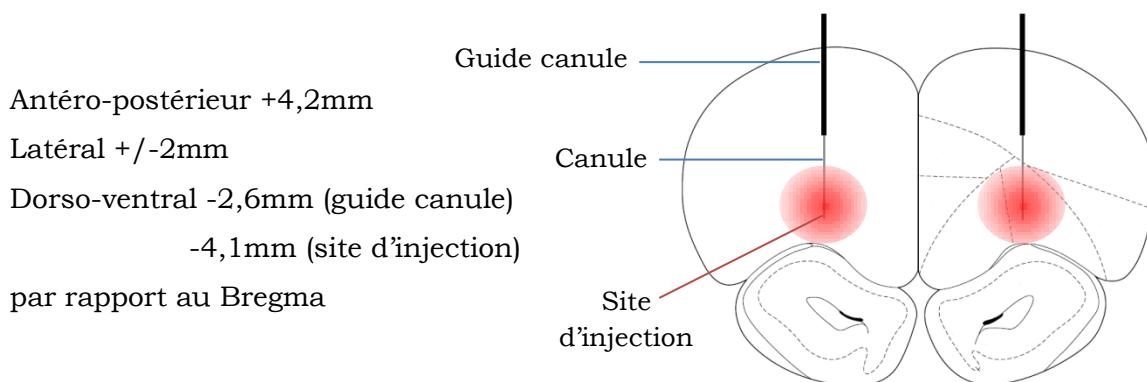


Figure 99 : Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler le cortex orbitofrontal (d'après l'atlas de Paxinos and Watson, 1998).

Antéro-postérieur +0,2mm
Latéral +/-0,5mm
Dorso-ventral -1,3mm (guide canule)
-2,8mm (site d'injection)
par rapport au Bregma

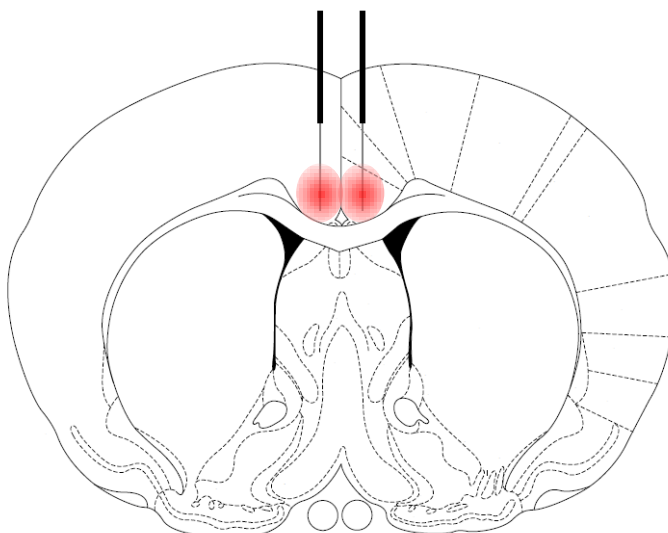


Figure 100 : Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler le cortex cingulaire antérieur (d'après l'atlas de Paxinos and Watson, 1998).

Antéro-postérieur -3,8mm
Latéral +/-2mm
Dorso-ventral -2,0mm (guide canule)
-3,5mm (site d'injection)
par rapport au Bregma

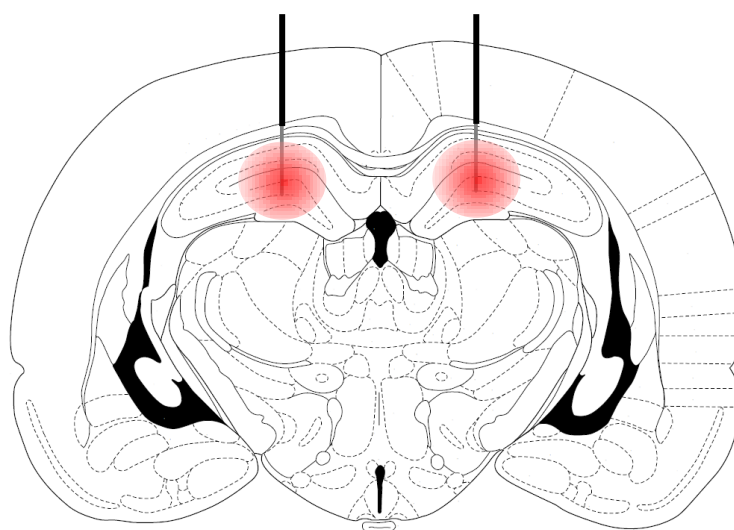


Figure 101 : Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler l'hippocampe dorsal (d'après l'atlas de Paxinos and Watson, 1998).

Drogues et modes d'injection

Le **Vatalanib** (appelé aussi PTK787/ZK222584) sous forme de sel dihydrochloride (LC laboratories, formule chimique $C_{20}H_{15}ClN_4 \cdot 2HCl$) est un anti-angiogénique ciblant les récepteurs au VEGF et au PDGF- β que nous avons utilisé dans le chapitre « approche invasive ». Différents modes d'injection ont été testés, par voie intrapéritonéale (i.p.) avec une injection de 1mL/kg d'une solution de Vatalanib dilué dans du NaCl 0,9% (concentration finale injectée de 25mg/kg ou 50mg/kg), par voie orale (à l'aide de

sondes de gavage) avec une injection de 2mL/kg d'une solution de Vatalanib dilué dans de l'eau distillée (concentration finale injectée de 50mg/kg), ou encore par voie intracérébrale avec une injection de 1µL en bilatéral dans le cortex orbitofrontal d'une solution de Vatalanib (2ng/µL) dilué dans du fluide cérébrospinal. A chaque fois, le groupe témoin a reçu la solution véhicule (solution saline, eau ou fluide cérébrospinal). Le détail de la procédure d'injection intracérébrale se trouve dans la partie suivante.

Le **fluide cérébrospinal artificiel (aCSF)**, artificial CerebroSpinal Fluid) a été utilisé pour les injections intracérébrales comme solution véhicule. Sa composition est la suivante : 5mM de glucose, 125mM de chlorure de sodium (NaCl), 27mM de carbonate de sodium (NaHCO₃), 2,5mM de chlorure de potassium (KCl), 0,5mM de sodium dihydrogénophosphate (NaH₂PO₄•2H₂O), 1,2mM d'hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄), 0,5mM de sulfate de sodium (Na₂SO₄), 1mM de chlorure de magnésium (MgCl₂•6H₂O) et 1mM de chlorure de calcium (CaCl₂•2H₂O).

Les **oligonucléotides antisens (ONAS)** anti-Ang-2 et leur « **scramble** » ont été injectés dans le cortex orbitofrontal des rats dans l'objectif d'y bloquer sélectivement l'angiogenèse en ciblant l'ARN messager de l'Angiopoïétine-2. La séquence des ADN est la suivante pour les ONAS : 5'-GCGTTAGACATGTAGGG-3' et pour le scramble, doté des mêmes bases dans un ordre différent et ne ciblant aucun ARNm particulier (injecté au groupe témoin) : 5'-GACGCGAGTTGAGGTTA-3'. L'outil BLAST a été utilisé afin de déterminer ces séquences qui ont ensuite été synthétisées par Eurogentec, achetées sous forme de poudre (diluées ensuite directement dans l'aCSF). Les ONAS et leur scramble ont été pourvus d'un squelette phosphorothioates remplaçant les liaisons phosphodiester de l'ADN afin d'augmenter leur stabilité et d'un fluorophore 6-FAM (excitation à 499nm, émission à 519nm) à leur extrémité 5' afin de pouvoir déterminer leur diffusion et leur distribution après injection. Ils ont été utilisés en injections intracérébrales bilatérales (volume 1µL) à des concentrations de 0,5µg/µL, 1µg/µL, 3µg/µL ou 6µg/µL (1µg/µL étant la concentration la plus adéquate, voir le chapitre « approche invasive »). Avant cela, nous avons aussi fait des essais d'injections caudales de rats vigiles avec l'aide d'Amandine Mouchard (CNRS UMR 5293). Pour cela, la queue est placée 1 minute dans de l'eau à 45°C afin de faire ressortir les veines ; le rat est ensuite maintenu par une personne pendant que l'autre pique dans une veine sur le côté de la queue et réalise l'injection intraveineuse. Nous avons eu recours à un agent de transfection (*in vivo*-jetPEI, Polyplus) pour optimiser la distribution des oligonucléotides au sein des cellules endothéliales. Nous avons injecté 200µg d'ADN avec 32µL d'*in vivo*-jetPEI dans 1mL de glucose 5% ou 450µg d'ADN avec 72µL d'*in vivo*-jetPEI dans 1,5mL de glucose 5%.

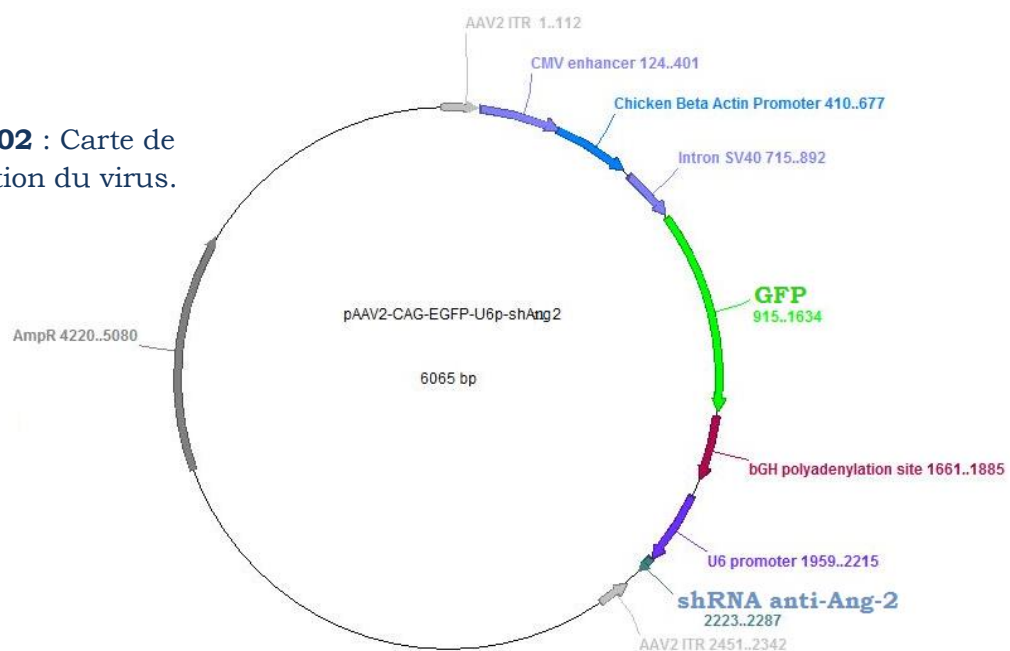
L'**Angiopoïétine-2 (Ang-2)** permet de stimuler l'angiogenèse en présence d'autres facteurs trophiques. Nous avons utilisé l'Angiopoïétine-2 recombinante humaine (R&D Systems) injectée de façon exogène bilatéralement au sein du cortex orbitofrontal, à 100ng/ μ L dans un volume de 1 μ L (dilution dans de l'aCSF).

Le **BrdU** (5-Bromo-2'-déoxyuridine, Sigma) est un analogue de la thymidine et s'incorpore dans l'ADN des cellules en division, il permet donc d'étudier la prolifération cellulaire. Il a été utilisé en injections i.p. répétées (toutes les 12 heures environ) à une concentration finale injectée de 75mg/kg (injection de 2mL/kg pour permettre une bonne dissolution). Il est dilué dans du tampon phosphate, préparé à base d'une solution à 0,1M de Na_2HPO_4 dont le pH a été ajusté à 8,4 à l'aide d'une solution à 0,1M de NaH_2PO_4 (~2,5mL dans 100mL de la solution initiale). Il peut ensuite être révélé à l'aide d'un anticorps anti-BrdU, voir la partie « marquages ».

Le **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-165 humain recombinant, R&D Systems) permet de développer le réseau vasculaire existant par angiogenèse. Il a été utilisé en injections intracérébrales bilatérales (1 μ L dans le cortex orbitofrontal ou 1,2 μ L dans l'hippocampe dorsal) à une concentration de 10ng/ μ L.

Le **CNQX** (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, Sigma) est un antagoniste des récepteurs AMPA, entraînant l'incapacité de l'élément postsynaptique à émettre des potentiels d'action en réponse aux afférences excitatrices. Le CNQX a été utilisé en injections intrahippocampiques bilatérales d'un volume de 1,2 μ L à 3mM.

Figure 102 : Carte de construction du virus.



Les **shRNA** dirigés contre Ang-2 ont été extraits avec le promoteur U6 les contrôlant de plasmides commandés chez OriGene Technologies, puis insérés au sein de plasmides

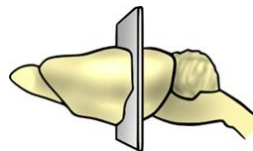
viraux. Leur séquence nucléotidique est : GAAGATGGCAGCGTTGACTTCCAGAGAAC. Nous avons utilisé des virus adéno-associés (AAVs) de pseudotype 2/9 (réplicase de sérotype 2, capside de sérotype 9) produits par Nathalie Dutheil (CNRS UMR 5293) et exprimant de plus la Green Fluorescent Protein GFP (figure 102). Leur titre est de $4,2 \cdot 10^{12}$ gcp (genome containing particles)/mL. Ils ont été utilisés en injections intracérébrales, sans dilution. Le virus contrôle utilisé exprime uniquement la GFP.

Procédure d'injection intracérébrale

Cinq jours avant la séance d'injection, les rats sont manipulés. Chacun des 4 jours précédant l'injection, leurs guides canules sont nettoyés à l'aide d'un tire-nerf, une canule de 9,5mm est de plus descendue 3 jours et 1 jour avant l'injection.

Toutes les injections intracérébrales ont été réalisées sur des rats alertes et libres de leurs mouvements à l'aide de canules (diamètre extérieur 0,229mm, diamètre intérieur 0,127mm, longueur 9,5mm) introduites dans les guides canules (longueur 8mm) implantés un mois auparavant. Le site d'injection se trouve donc 1,5mm plus bas que l'extrémité ventrale des guides (figures 99, 100 et 101). Chaque canule est connectée par un cathéter en polyéthylène à une seringue Hamilton de 5 μ L montée sur une pompe à perfusion (Harvard Apparatus) assurant une injection à vitesse constante de 1 μ L/min. Les 2 canules ne sont retirées que 90 secondes après la fin de l'injection bilatérale (1 μ L dans le cortex orbitofrontal, 1,2 μ L dans l'hippocampe dorsal et 0,5 μ L dans le cortex cingulaire antérieur) pour assurer une bonne diffusion de la drogue.

Perfusion et coupes



Les animaux sur lesquels nous souhaitons effectuer des marquages ont été anesthésiés par injection i.p. de pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, 300 mg/kg). Ils ont ensuite subi une perfusion intracardiaque lente (14mL/mn) pour préserver l'intégrité des vaisseaux sanguins, avec une solution saline héparinée (300mL, NaCl 0,9%, héparine 2,8mL/L) puis avec du paraformaldéhyde froid à 4% (300mL, PFA 4%) en solution dans du tampon phosphate (PB 0,1M) afin de fixer les tissus.

Les animaux ont été décapités et les cerveaux prélevés avant d'être coupés au vibratome en coupes frontales de 40 μ m d'épaisseur. Ils ont ensuite été placés dans une solution cryoprotectrice en attendant que les marquages soient effectués.

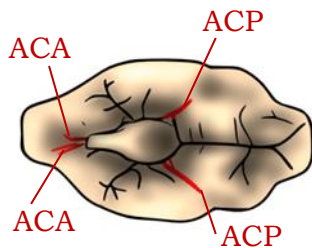
Suivant les marquages voulus, les cerveaux ont été ou non postfixés 24h entre leur prélèvement après perfusion et leur coupe au vibratome. Ils ont été postfixés dans le cas

des injections d'oligonucléotides taggés et avant d'effectuer des marquages immunohistochimiques pour révéler le BrdU, le collagène IV, NeuN et RECA-1 ; ils ne l'ont pas été avant les marquages à la lectine (ne supportant pas la post-fixation) et donc pas non plus avant les marquages immunohistochimiques pour révéler l'Endogline et Tie2, effectués sur les mêmes coupes.

Imagerie calcique sur vaisseaux cérébraux isolés

Cette méthode permet d'étudier certains aspects de la signalisation calcique au sein de vaisseaux maintenus *ex vivo*. Elle a été utilisée pour en révéler d'éventuelles modifications au cours du processus de consolidation mnésique.

Afin de ne pas affecter la réactivité des vaisseaux sanguins par des anesthésiques, les rats dont les vaisseaux ont été testés en imagerie calcique ont été guillotisés alertes immédiatement après le test de préférence, réalisé 1 ou 30 jours après l'interaction sociale.



Les ramifications des artères cérébrales antérieures (ACA) et des artères cérébrales postérieures (ACP), artères piales irriguant les artérioles et capillaires des régions d'intérêt, ont été prélevées le plus rapidement possible et maintenues *ex vivo* (figure 103).

Figure 103 : Vaisseaux prélevés.

Les vaisseaux sont collés sur des lamelles recouvertes de Cell Tak (BD Biosciences) pour éviter qu'ils ne se déplacent lors de l'application de médiateurs provoquant leur contraction, et ces lamelles sont placées dans des boîtes de culture (figure 104) contenant 500µL de milieu de culture GIBCO M199

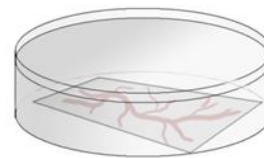


Figure 104 : Boîte de culture contenant un vaisseau collé au Cell Tak sur une lamelle.

(Invitrogen). Ces boîtes sont placées dans un incubateur à 37°C à 5% CO₂, puis les vaisseaux sont chargés en sonde Fluo-8 acetoxymethylester (AM) (Fluoprobes), diluée dans le milieu pour atteindre la concentration finale de 1µM. Les sondes pénètrent dans les cellules musculaires lisses grâce à la partie AM qui masque les charges négatives sur les groupements carboxyles de la molécule. Sous cette forme non chargée, les sondes sont hydrophobes et peuvent passer à travers la membrane plasmique. La partie AM est ensuite clivée dans les cellules par les estérases endogènes, entraînant l'accumulation de la sonde active Fluo-8 dans les cellules musculaires. L'incubation en présence de la sonde dure 20 minutes.

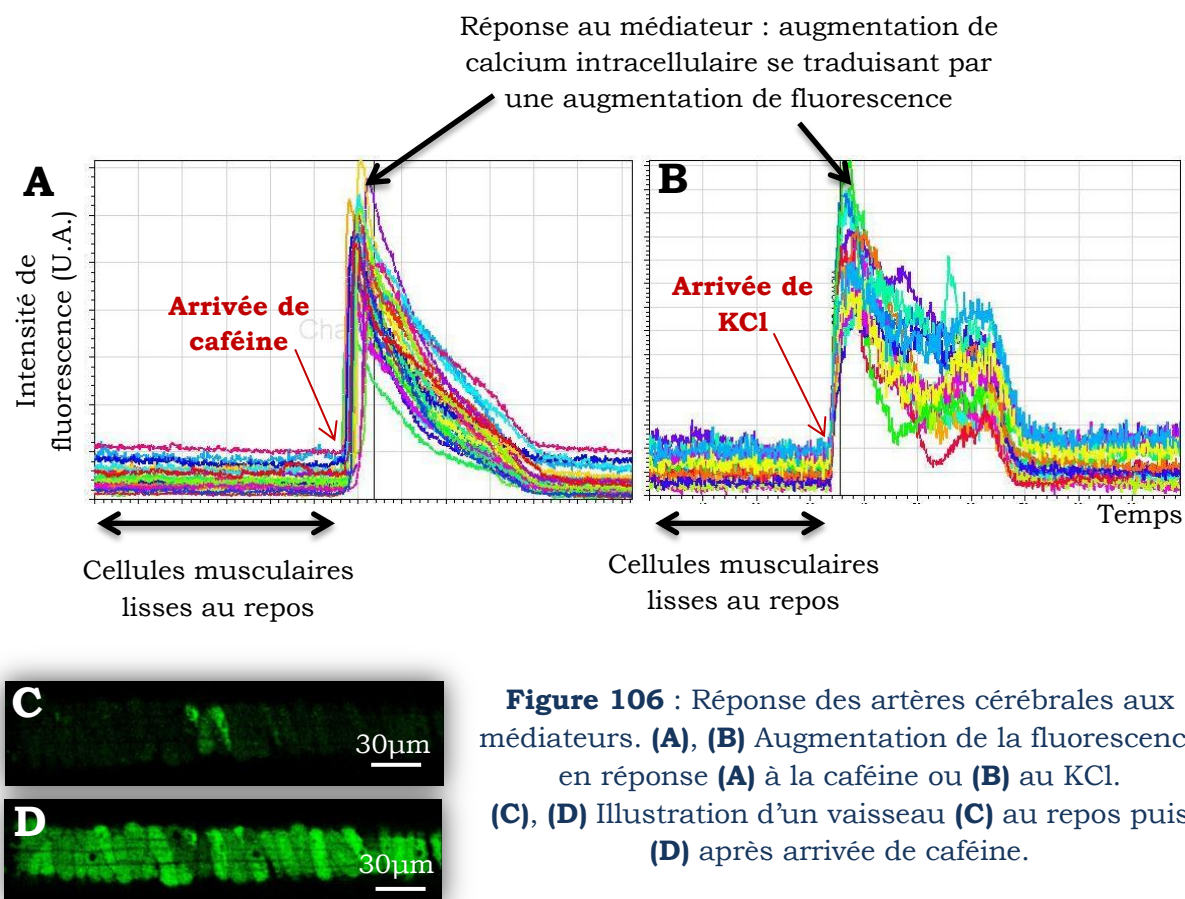
La réactivité des vaisseaux prélevés a été testée par imagerie calcique. La sonde Fluo-8 possède des groupements carboxyles qui lui permettent de se lier au calcium et un groupement aromatique responsable de la fluorescence. Lorsque le calcium se lie à la sonde, la fluorescence varie : elle augmente avec la concentration calcique intracellulaire (figures 106C et 106D). Nous avons détecté l'émission de fluorescence à l'aide d'un microscope confocal Leica SP5 (figure 105), après excitation de la sonde avec la raie bleue du laser Argon à 488nm. Pour cela, les lamelles avec les vaisseaux ont été placées dans une cuve placée sous l'objectif du microscope et perfusée avec une solution physiologique, le Mac Ewen (NaCl 125mM, KCl 5,6mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, glucose 11mM, HEPES 8mM, pH ajusté à 7,4).



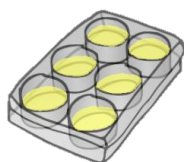
Figure 105 : Imagerie au microscope confocal.

Nous avons utilisé deux médiateurs, la caféine et le chlorure de potassium (KCl), qui permettent de révéler l'état des vaisseaux et leur capacité à réagir. La caféine (10mM) libère le calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique par activation des canaux sensibles à la ryanodine. L'application d'un milieu extracellulaire riche en KCl (140 mM) crée une dépolarisation qui fait entrer le calcium dans les cellules par les canaux calciques voltage-dépendants. Ces augmentations de concentration calcique intracellulaire activent les protéines contractiles des cellules musculaires lisses et entraînent la contraction du vaisseau. L'étude des réponses à ces médiateurs est ainsi une façon indirecte de révéler la capacité de contraction d'un vaisseau.

Sur la figure 106 en page suivante, chaque courbe représente l'intensité moyenne de fluorescence dans une cellule musculaire lisse d'un même vaisseau. Pour chaque rat, nous avons enregistré les réponses caféine et KCl de 4 zones différentes par vaisseau, et sélectionné celles de diamètre compris entre 15 et 35 microns (artérioles). Les courbes de fluorescence ont été traitées à l'aide du logiciel LEICA system, nous avons mesuré pour chaque cellule réagissant au médiateur le rapport fluorescence maximale/fluorescence au repos (noté F/F₀) qui nous renseigne sur la variation de concentration calcique provoquée par le médiateur.



Marquages



Le rinçage des coupes flottantes a été effectué pour tous les marquages dans du tampon phosphate PB 0,1M. Pour les marquages immunohistochimiques, le tampon de blocage utilisé pour l'incubation des anticorps à 4°C avait systématiquement la composition suivante pour 100mL préparés dans du PB 0,1 : 0,1g de BSA, 200µL de triton, 2mL de sérum de l'espèce chez laquelle l'anticorps secondaire a été produit.

Le marquage **lectine** permet de visualiser tout le réseau vasculaire. La lectine RCA₁₂₀ se lie spécifiquement aux glycoprotéines de surface des cellules endothéliales. Les coupes flottantes (non post-fixées après la perfusion) ont été initialement bouillies 20 secondes dans le citrate-trisodium, puis nous avons utilisé la lectine RCA₁₂₀ directement couplée à un fluorophore vert FITC (Vector, dilution 1/100, durée d'incubation 10mn). Une fois les coupes rincées, elles ont été montées sur des lames gélatinées avec le milieu de montage Vectashield (contenant du Dapi, marquant les noyaux cellulaires), le seul que nous avons essayé donnant un marquage à la lectine satisfaisant.

Nous avons révélé par immunofluorescence l'expression de **Tie2**, protéine surexprimée au sein des cellules endothéliales proliférantes. Les coupes ont été initialement bouillies dans le citrate-trisodium puis perméabilisées 1h dans un tampon de blocage. Nous avons utilisé un anticorps primaire anti-Tie2 obtenu chez le lapin (Santa Cruz, dilution 1/400, durée d'incubation 12h) puis un anticorps secondaire anti-lapin obtenu chez la chèvre couplé au fluorophore FP488 (Fluoprobes, dilution 1/200, durée d'incubation 1h30), tous deux incubés dans le tampon de blocage.

Concernant l'**Endogline**, protéine fortement exprimée au sein des cellules endothéliales proliférantes (dans les tumeurs et au niveau des sites d'inflammation), les coupes ont aussi été initialement bouillies dans le citrate-trisodium. Elles ont ensuite été perméabilisées 1h dans un tampon de blocage avant l'incubation avec un anticorps primaire anti-Endogline obtenu chez la chèvre (Santa Cruz, dilution 1/200, durée d'incubation 12h). Un anticorps secondaire anti-chèvre obtenu chez l'âne et couplé au fluorophore FP488 a ensuite été utilisé (Fluoprobes, dilution 1/200, durée d'incubation 1h30), tous deux incubés dans le tampon de blocage.

Nous avons révélé par immunofluorescence **Hif-1 α** , protéine induite en conditions hypoxiques et favorisant l'angiogenèse. Les coupes ont été initialement bouillies dans le citrate-trisodium, puis perméabilisées 1h dans un tampon de blocage avant l'incubation avec un anticorps primaire anti-Hif-1 α obtenu chez la souris (Novus Biologicals, dilution 1/50, durée d'incubation 12h). Un anticorps secondaire anti-souris obtenu chez l'âne et couplé au fluorophore FP488 a ensuite été utilisé (Fluoprobes, dilution 1/400, durée d'incubation 1h30), tous deux incubés dans le tampon de blocage.

Une autre façon de marquer le réseau vasculaire que la lectine est de révéler **RECA-1** (Rat Endothelial Cell Antigen-1), antigène exprimé à la surface de toutes les cellules endothéliales matures chez le rat. Contrairement au marquage à la lectine, le marquage immunohistochimique anti-RECA-1 peut se faire sur coupes post-fixées 24h dans du PFA 4%. Nous l'avons utilisé uniquement dans le dernier chapitre de résultats (« un principe généralisable ? », partie IV). Les coupes ont été perméabilisées 1h avant incubation avec un anticorps primaire anti-RECA-1 obtenu chez la souris (AbD Serotec Biorad, dilution 1/500, durée d'incubation 12h) suivie d'une incubation avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorophore A488 obtenu chez l'âne (Alexa, dilution 1/500, durée d'incubation 2h), toutes deux dans un tampon de blocage. Une fois les coupes rincées, elles ont été montées sur des lames gélatinées avec le milieu de montage Fluoromount, donnant un marquage RECA satisfaisant contrairement au milieu de montage Vectashield.

Enfin, sur des coupes post-fixées 24h dans du PFA 4%, nous avons effectué un triple marquage **BrdU** (pour révéler les cellules qui étaient en division durant la période des injections de BrdU), **Collagène IV** (protéine spécifique des lames basales, permettant de visualiser le réseau vasculaire mature et en début de formation) et **NeuN** (antigène nucléaire neuronal, classiquement utilisé pour marquer les neurones). Les coupes ont été initialement bouillies dans le citrate-trisodium, puis perméabilisées 1h dans un tampon de blocage avant l'incubation pendant 12h avec les anticorps primaires rat anti-BrdU (AbD serotec Biorad, dilution 1/200), lapin anti-Collagène IV (Abcam, dilution 1/250) et souris anti-NeuN (Chemicon, dilution 1/200). Les anticorps secondaires chèvre anti-rat A546, chèvre anti-lapin A488 et âne anti-souris A405 ont ensuite été utilisés (Alexa, dilution 1/500, durée d'incubation 1h30). Une fois les coupes rincées, elles ont été montées sur des lames gélatinées avec le milieu de montage Fluoromount.

Analyse d'images

Les images des marquages à la lectine, anti-Tie2 et anti-Endogline ont été acquises au microscope confocal Leica SP5, après excitation à 488nm. Concernant le marquage révélant RECA-1, les acquisitions ont été faites au scanner de lames (Hamamatsu Nanozoomer 2.0) du Bordeaux Imaging Center (BIC) et les images extraites à l'aide du plugin NDPITools pour le logiciel ImageJ.

Dans cette thèse, nous avons analysé les images dans 4 régions cérébrales (figure 107).

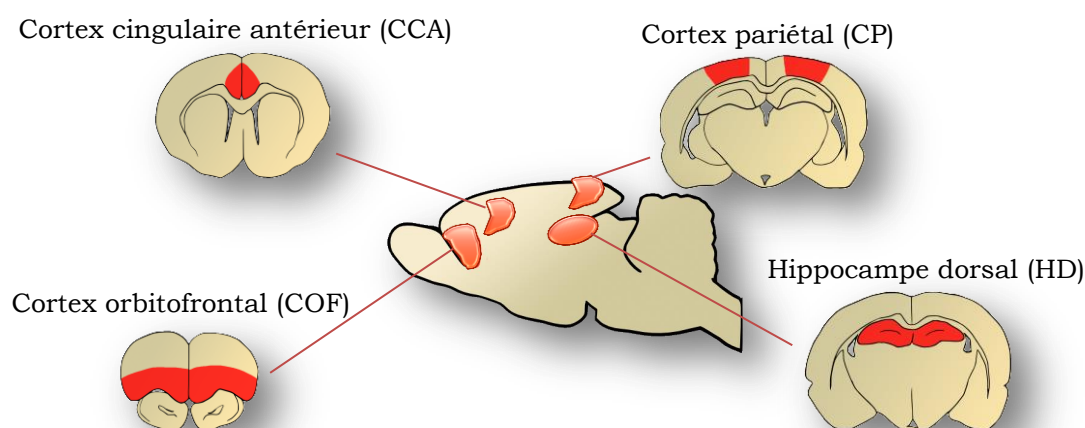


Figure 107 : Régions cérébrales d'intérêt, représentées en rouge sur la coupe sagittale de cerveau de rat et les coupes frontales correspondantes. (d'après l'atlas de Paxinos and Watson, 1998).

Dans le second chapitre de résultats (« approche corrélative : architecture vasculaire », partie II), 1 coupe sur 5 a été analysée, ce qui correspond en moyenne à 7 coupes de

COF, 8 coupes de CCA, 8 coupes d'HD et 3 coupes de CP par animal. Les images de toute la zone d'intérêt sur chacune de ces coupes ont été acquises au SP5 au grossissement x10, puis analysées avec le logiciel ImageJ. La densité vasculaire a été calculée sur une image noir et blanc obtenue en exécutant les commandes *Subtract Background* (10 pixels), *Adjust Threshold* (seuil ajusté en fonction de la qualité du marquage), *Remove Outliers* (2 pixels sombres ; 1,5 pixels clairs). La commande *Measure* permet ensuite de déterminer la couleur moyenne de l'image, et lorsque les vaisseaux apparaissent en blanc sur fond noir on calcule la densité vasculaire comme suit : $100 \times (\text{indice couleur moyenne}) / (255 = \text{indice couleur blanche})$. Ces ajustements d'image ont été regroupés dans une macro travaillant sous imageJ permettant ainsi d'automatiser ces traitements. Elle a été développée par Adeline Posin (IMN UMR 5293) et Sébastien Marais (plateforme BIC).

Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Angiotool (généreusement donné à Nathalie Macrez par un de ses auteurs, Laure Gambardella) afin de déterminer la densité d'embranchements vasculaires. La figure 108 illustre ces différentes étapes.

Les calculs de densité vasculaire et de densité d'embranchements de vaisseaux sanguins réalisés dans le chapitre « approche invasive » (partie IV) ont suivi la même démarche à partir de l'analyse d'une coupe tous les 120µm dans la zone d'injection.

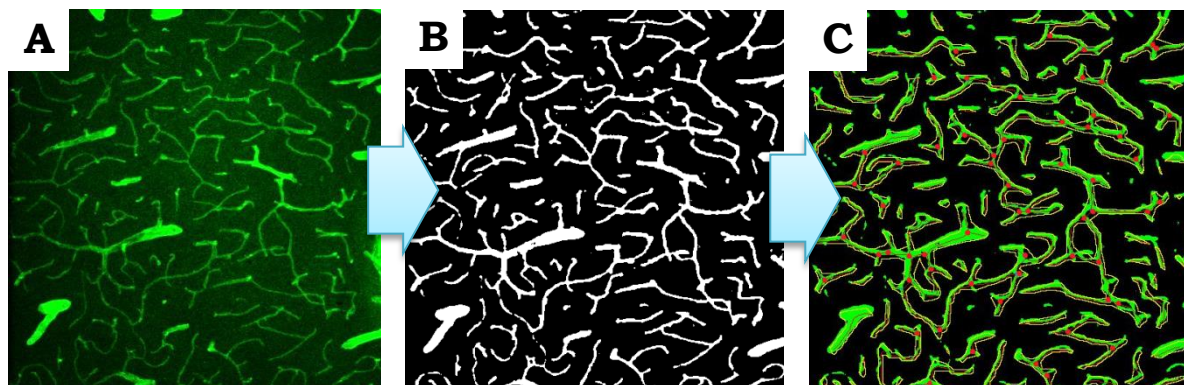


Figure 108 : Analyse des images. **(A)** Image originale, marquage à la lectine-FITC du réseau vasculaire acquise au microscope confocal. **(B)** Traitement sous ImageJ permettant de calculer la densité vasculaire. **(C)** Détection des embranchements (points rouges) à l'aide du logiciel Angiotool.

Statistiques

L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. Pour chaque groupe, les données comportementales et vasculaires ont été exprimées sous forme de moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne. La normalité des données a été

vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk afin d'utiliser ensuite les tests statistiques adéquats.

Les comparaisons entre 2 groupes ont été réalisées au moyen d'un t-test non apparié lorsque la distribution des données suivait une loi normale, ou d'un test de Mann Whitney dans le cas contraire.

Dans les chapitres « approche corrélative : réactivité vasculaire » (partie II) et « approche corrélative : architecture vasculaire » (partie II) mettant en jeu des groupes de rats expérimentaux et contrôles testés à J1 ou J30, les comparaisons entre groupes ont été réalisées au moyen d'une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (groupe, délai) suivie d'un test post-hoc de Bonferroni (permettant de comparer ensuite deux à deux les différents groupes), lorsque la répartition des données suivait une loi normale. Lorsque ce n'était pas le cas, nous avons eu recours à un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn (seuls les résultats comportementaux des rats utilisés ensuite en imagerie calcique ont nécessité l'utilisation du test de Kruskal-Wallis).

Pour toutes les comparaisons effectuées, un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$) devait être atteint pour que les différences observées soient considérées significatives.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Adams RH, Eichmann A (2010) Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001875.
- Aggleton JP, Brown MW (2005) Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B* 58:218-233.
- Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R (2002) The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5:75-80.
- Ali MM, Janic B, Babajani-Feremi A, Varma NR, Iskander AS, Anagli J, Arbab AS (2010) Changes in vascular permeability and expression of different angiogenic factors following anti-angiogenic treatment in rat glioma. *PLoS One* 5:e8727.
- Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7041-7045.
- Alvarez P, Wendelken L, Eichenbaum H (2002) Hippocampal formation lesions impair performance in odor-odor association task independently of spatial context. *Neurobiology of Learning and Memory* 78:470-476.
- Ambrose CT (2012) Neuroangiogenesis: a vascular basis for Alzheimer's disease and cognitive decline during aging. *J Alzheimers Dis* 32:773-788.
- Armstead WM, Raghupathi R (2011) Endothelin and the neurovascular unit in pediatric traumatic brain injury. *Neurol Res* 33:127-132.
- Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232-243.
- Audero E, Cascone I, Zanon I, Previtali SC, Piva R, Schiffer D, Bussolino F (2001) Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: in vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:536-541.
- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49:32-40.

B

- Barlow CA, Rose P, Pulver-Kaste RA, Lounsbury KM (2006) Excitation-transcription coupling in smooth muscle. *J Physiol* 570:59-64.
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, Zhu Z, Nedrelow JH, Chupp GL, Zhang X, Matthay MA, Ware LB, Homer RJ, Lee PJ, Geick A, de Fougères AR, Elias JA (2006) Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nat Med* 12:1286-1293.

- Banerjee S, Bhat MA (2007) Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci* 30:235-258.
- Barnett SA (1963) Smell and taste. *Dev Med Child Neurol* 25:516-517.
- Bastide M, Ouk T, Plaisier F, Pétrault O, Stolc S, Bordet R (2007) Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* 32:S36-39.
- Berlyne DE (1950) Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *Brit J Psychol* 41:68-80.
- Berridge MJ (2008) Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 586:5047-5061.
- Black JE, Sirevaag AM, Greenough WT (1987) Complex experience promotes capillary formation in young rat visual cortex. *Neurosci Lett* 83:351-355.
- Blum S, Hebert AE, Dash PK (2006) A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17:341-344.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671-675.
- Boye SM, Pradhan AA, Grant RJ, Clarke PB (2002) Evidence for sequence-dependent and reversible nonspecific effects of PS-capped antisense treatment after intracerebral administration. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12:95-102.
- Brown JL, Cao ZA, Pinzon-Ortiz M, Kendrew J, Reimer C, Wen S, Zhou JQ, Tabrizi M, Emery S, McDermott B, Pablo L, McCoon P, Bedian V, Blakey DC (2010) A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 9:145-156.
- Brozici M, van der Zwan A, Hillen B (2003) Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: a review. *Stroke* 34:2750-2762.
- Bunsey M, Eichenbaum H (1995) Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus* 5:546-556.
- Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA (2012) Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus* 22:1795-1808.
- Burnett JC, Rossi JJ (2012) RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol* 19:60-71.
- Burwell RD, Amaral DG (1998) Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398:179-205.

C

- Calu DJ, Roesch MR, Stalnaker TA, Schoenbaum G (2007) Associative encoding in posterior piriform cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cereb Cortex* 17:1342-1349.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-835.
- Carmeliet P (2003) Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 4:710-720.
- Carmeliet P, Jain RK (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307.
- Carnevale D, Mascio G, D'Andrea I, Fardella V, Bell RD, Branchi I, Pallante F, Zlokovic B, Yan SS, Lembo G (2012) Hypertension induces brain β -amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature. *Hypertension* 60:188-197.
- Casaleto JB, McClatchey AI (2012) Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:387-400.
- Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D (2005) Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299-309.
- Chaigneau E, Oheim M, Audinat E, Charpak S (2003) Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13081-13086.
- Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige JJ, Cherradi N (2011) Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 22:3366-3378.
- Clark RE, Broadbent NJ, Zola SM, Squire LR (2002) Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus and subiculum. *J Neurosci* 22:4663-4669.
- Cimpean AM, Ribatti D, Raica M (2011) A brief history of angiogenesis assays. *Int J Dev Biol* 55:377-382.
- Cohen-Matsliah SI, Rosenblum K, Barkai E (2009) Olfactory-learning abilities are correlated with the rate by which intrinsic neuronal excitability is modulated in the piriform cortex. *Eur J Neurosci* 30:1339-1348.

Cole WC, Welsh DG (2011) Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys* 510:160-173.

Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* 352:567-593.

Corkin S (1984) Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: clinical course and experimental findings in H.M. *Semin. Neurol.* 4:249-259.

Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* 3:153-160.

Coxon A, Bready J, Min H, Kaufman S, Leal J, Yu D, Lee TA, Sun JR, Estrada J, Bolon B, McCabe J, Wang L, Rex K, Caenepeel S, Hughes P, Cordover D, Kim H, Han SJ, Michaels ML, Hsu E, Shimamoto G, Cattley R, Hurh E, Nguyen L, Wang SX, Ndifor A, Hayward IJ, Falcón BL, McDonald DM, Li L, Boone T, Kendall R, Radinsky R, Oliner JD (2010) Context-dependent role of angiopoietin-1 inhibition in the suppression of angiogenesis and tumor growth: implications for AMG 386, an angiopoietin-1/2-neutralizing peptibody. *Mol Cancer Ther* 9:2641-2651.

Coyle P (1982) Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 13:855-859.

Critchley HD, Rolls ET (1996) Olfactory neuronal responses in the primate orbitofrontal cortex: analysis in an olfactory discrimination task. *J Neurophysiol* 75:1659-1672.

Croll SD, Ransohoff RM, Cai N, Zhang Q, Martin FJ, Wei T, Kasselman LJ, Kintner J, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2004) VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Exp Neurol* 187:388-402.

D

Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE (2013) Ryanodine receptors, calcium signaling, and regulation of vascular tone in the cerebral parenchymal microcirculation. *Microcirculation* 20:307-316.

De Palma M, Naldini L (2011) Angiopoietin-2 TIEs up macrophages in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 17:5226-5232.

De Roo M, Klauser P, Garcia PM, Poggia L, Muller D (2008) Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog Brain Res* 169:199-207.

Deryugina EI, Quigley JP (2010) Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta* 1803:103-120.

Dix SL, Aggleton JP (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 99:191-200.

Dorr A, Sled JG, Kabani N (2007) Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage* 35:1409-1423.

Dotti CG, De Strooper B (2009) Alzheimer's dementia by circulation disorders: when trees hide the forest. *Nat Cell Biol* 11:114-116.

Dreves J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Müller M, Wood J, Martiny-Baron G, Unger C, Marmé D (2000) Effects of PTK787/ZK 222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 60:4819-4824.

Dreves J, Müller-Driver R, Wittig C, Fuxius S, Esser N, Hugenschmidt H, Konerding MA, Allegrini PR, Wood J, Hennig J, Unger C, Marmé D (2002) PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 62:4015-4022.

Duchemin S, Boily M, Sadekova N, Girouard H (2012) The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front Neural Circuits* 6:51.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86.

E

Eichenbaum H (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1:41-50.

Engelhardt E, Moreira DM, Laks J (2007) Vascular dementia and the cholinergic pathways. *Dement Neuropsychol* 1:2-9.

Ethell IM, Ethell DW (2007) Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 85:2813-2823.

F

Fan C, Zhang M, Shang L, Cynthia NA, Li Z4, Yang Z, Chen D, Huang J, Xiong K (2014) Short-term environmental enrichment exposure induces proliferation and maturation of doublecortin-positive cells in the prefrontal cortex. *Neural Regen Res* 9:318-328.

Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116:829-840.

Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG (2004) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 103:4150-4156.

Filosa JA, Bonev AD, Nelson MT (2004) Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res* 95:73-81.

Follesa P, Ticku MK (1996) NMDA receptor upregulation: molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J Neurosci* 16:2172-2178.

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881-883.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119-130.

G

Galef BG, Wigmore SW (1983) Transfer of information concerning distant foods: a laboratory investigation of the "information-centre" hypothesis. *Anim Behav* 31:748-758.

Galef BG, Kennett DJ, Stein M (1985) Demonstrator influence on observer diet preference: Effects of simple exposure and the presence of a demonstrator. *Animal Learning & Behavior* 13:25-30.

Galef BG, Jr., Mason JR, Preti G, Bean NJ (1988) Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. *Physiol Behav* 42:119-124.

Galef BG, Jr., Whiskin EE (1998) Limits on social influence on food choices of Norway rats. *Anim Behav* 56:1015-1020.

Galef BG (2003) Social learning of food preferences in rodents: rapid appetitive learning. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 5D.

Galef BG, Whiskin EE (2008) Effectiveness of familiar kin and unfamiliar nonkin demonstrator rats in altering food choices of their observers. *Anim Behav* 76:1381-1388.

Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA (2007) Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55:1214-1221.

Greenough WT, Bailey CH (1988) Anatomy of memory: convergence of results across a diversity of tests. *Trends Neurosci* 11:142-147.

Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, Ge S (2012) Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci* 15:1700-1706.

Guibert R, Fonta C, Risser L, Plouraboué F. (2012) Coupling and robustness of intra-cortical vascular territories. *Neuroimage* 62:408-417.

H

Haberly LB, Bower JM (1989) Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? *Trends Neurosci* 12:258-264.

Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, Bloch W, Kurz H, Javerzat S, Rousseau B, Wilting J, Bikfalvi A (2004) VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn* 230:23-33.

Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508:55-60.

Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Hsiang HL, Buch T, Waisman A, Bontempi B, Neve RL, Frankland PW, Josselyn SA (2009) Selective erasure of a fear memory. *Science* 323:1492-1496.

Hao Q, Chen Y, Zhu Y, Fan Y, Palmer D, Su H, Young WL, Yang GY (2007) Neutrophil depletion decreases VEGF-induced focal angiogenesis in the mature mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1853-1860.

Harb R, Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J (2013) In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:146-156.

Hellberg C, Ostman A, Heldin CH (2010) PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res* 180:103-114.

Herbst RS, Hong D, Chap L, Kurzrock R, Jackson E, Silverman JM, Rasmussen E, Sun YN, Zhong D, Hwang YC, Evelhoch JL, Oliner JD, Le N, Rosen LS (2009) Safety, pharmacokinetics, and antitumor activity of AMG 386, a selective angiopoietin inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 27:3557-3565.

Horton BN, Solanki RB, Rajneesh KF, Kulesza P, Ardelt AA (2010) Localization of angiopoietin-1 and Tie2 immunoreactivity in rodent ependyma and adjacent blood vessels suggests functional relationships. *J Histochem Cytochem* 58:53-60.

Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.

Huber R, Ghilardi MF, Massimini M, Tononi G (2004) Local sleep and learning. *Nature* 430:78-81.

I

Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.

Ido Y, Chang K, Woolsey TA, Williamson JR (2001) NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. *FASEB J* 15:1419-1421.

K

Kasselman LJ, Kintner J, Sideris A, Pasnikowski E, Krellman JW, Shah S, Rudge JS, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Croll SD (2007) Dexamethasone treatment and ICAM-1 deficiency impair VEGF-induced angiogenesis in adult brain. *J Vasc Res* 44:283-291.

Kerr AL, Steuer EL, Pochtarev V, Swain RA (2010) Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience* 171:214-226.

Kim JJ, Baxter MG (2001) Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci* 24:324-330.

Knafo S, Ariav G, Barkai E, Libersat F (2004) Olfactory learning-induced increase in spine density along the apical dendrites of CA1 hippocampal neurons. *Hippocampus* 14:819-825.

Kole R, Krainer AR, Altman S (2012) RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11:125-140.

Korol DL (2002) Enhancing cognitive function across the life span. *Ann N Y Acad Sci* 959:167-179.

Krucker T, Lang A, Meyer EP (2006) New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics. *Microsc Res Tech* 69:138-147.

Krum JM, Mani N, Rosenstein JM (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* 110:589-604.

L

Laemmel E, Genet M, Le Goualher G, Perchant A, Le Gargasson JF, Vicaut E (2004) Fibered confocal fluorescence microscopy (Cell-viZio) facilitates extended imaging in the field of microcirculation. A comparison with intravital microscopy. *J Vasc Res* 41:400-411.

Lay CC, Davis MF, Chen-Bee CH, Frostig RD (2011) Mild sensory stimulation reestablishes cortical function during the acute phase of ischemia. *J Neurosci* 31:11495-11504.

Lechner HA, Squire LR, Byrne JH (1999) 100 years of consolidation - remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77-87.

Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.

Lee OH, Xu J, Fueyo J, Fuller GN, Aldape KD, Alonso MM, Piao Y, Liu TJ, Lang FF, Bekele BN, Gomez-Manzano C (2006) Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic

glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 4:915-926.

Lee SW, Moskowitz MA, Sims JR (2007) Sonic hedgehog inversely regulates the expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in fibroblasts. *Int J Mol Med* 19:445-451.

Lee TJ, Chang HH, Lee HC, Chen PY, Lee YC, Kuo JS, Chen MF (2011) Axo-axonal interaction in autonomic regulation of the cerebral circulation. *Acta Physiol (Oxf)* 203:25-35.

Lesburguères E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011) Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 331:924-928.

Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659-665.

Lewis CE, Ferrara N (2011) Multiple effects of angiopoietin-2 blockade on tumors. *Cancer Cell* 19:431-433.

Licht T, Goshen I, Avital A, Kreisel T, Zubedat S, Eavri R, Segal M, Yirmiya R, Keshet E (2011) Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:5081-5086.

Lin TN, Wang CK, Cheung WM, Hsu CY (2000) Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:387-395.

Lipton PA, Alvarez P, Eichenbaum H (1999) Crossmodal associative memory representations in rodent orbitofrontal cortex. *Neuron* 22:349-359.

Lobov IB, Brooks PC, Lang RA (2002) Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11205-11210.

López-Novoa JM, Bernabeu C (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H959-974.

M

Madri JA (2009) Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4:95-104.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.

- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:23-81.
- Marteau L, Pacary E, Valable S, Bernaudin M, Guillemot F, Petit E (2011) Angiopoietin-2 regulates cortical neurogenesis in the developing telencephalon. *Cereb Cortex* 21:1695-1702.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99.
- Mazzieri R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, Politi LS, Gentner B, Brown JL, Naldini L, De Palma M (2011) Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 19:512-526.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419-457.
- McNay EC, Gold PE (2001) Age-related differences in hippocampal extracellular fluid glucose concentration during behavioral testing and following systemic glucose administration. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B66-71.
- Messier C (2004) Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol* 490:33-57.
- Mitschelen M, Garteiser P, Carnes BA, Farley JA, Doblas S, Demoe JH, Warrington JP, Yan H, Nicolle MM, Towner R, Sonntag WE (2009) Basal and hypercapnia-altered cerebrovascular perfusion predict mild cognitive impairment in aging rodents. *Neuroscience* 164:918-928.
- Morancho A, Hernández-Guillamon M, Boada C, Barceló V, Giralt D, Ortega L, Montaner J, Rosell A (2013) Cerebral ischaemia and matrix metalloproteinase-9 modulate the angiogenic function of early and late outgrowth endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 17:1543-1553.
- Morel JL, Fritz N, Dabertrand F, Macrez N (2007). Ca²⁺ releasing channels of the smooth muscle sarcoplasmic reticulum, *New Frontiers in Smooth Muscle Biology and Physiology* 131-150.
- Morita S, Ukai S, Miyata S (2013) VEGF-dependent continuous angiogenesis in the median eminence of adult mice. *Eur J Neurosci* 37:508-518.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207:35-66.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.

Muoio V, Persson PB, Sendeski MM (2014) The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)* 210:790-798.

N

Nag S, Papneja T, Venugopalan R, Stewart DJ (2005) Increased angiopoietin2 expression is associated with endothelial apoptosis and blood-brain barrier breakdown. *Lab Invest* 85:1189-1198.

Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ (1995) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270:633-637.

Neumann ID (2000) Antisense oligodeoxynucleotide effects on the hypothalamic-neurohypophyseal system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Methods* 22:227-237.

Niimi H (2003) Cerebral angiogenesis induced by growth factors: intravital microscopic studies using models. *Clin Hemorheol Microcirc* 29:149-156.

Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Lyden PD, Kleinfeld D (2007) Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:365-370.

Nonaka H, Akima M, Nagayama T, Hatori T, Zhang Z, Ihara F (2003) Microvasculature of the human cerebral meninges. *Neuropathology* 23:129-135.

Norup Nielsen A, Lauritzen M (2001) Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *J Physiol* 533:773-785.

Nucera S, Bizziato D, De Palma M (2011) The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int J Dev Biol* 55:495-503.

O

O'Keefe J, Nadel L (1978) *Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon, Oxford.

Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E, Tang X, Kim H, Meyer S, Han SJ, Hawkins N, Rosenfeld R, Davy E, Graham K, Jacobsen F, Stevenson S, Ho J, Chen Q, Hartmann T, Michaels M, Kelley M, Li L, Sitney K, Martin F, Sun JR, Zhang N, Lu J, Estrada J, Kumar R, Coxon A, Kaufman S, Pretorius J, Scully S, Cattley R, Payton M, Coats S, Nguyen L, Desilva B, Ndifor A, Hayward I, Radinsky R, Boone T, Kendall R (2004) Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell* 6:507-516.

Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38:258-268.

P

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.

Pati S, Orsi SA, Moore AN, Dash PK (2009) Intra-hippocampal administration of the VEGF receptor blocker PTK787/ZK222584 impairs long-term memory. *Brain Res* 1256:85-91.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edition. Academic Press.

Peigneux P, Laureys S, Fuchs S, Collette F, Perrin F, Reggers J, Phillips C, Degueldre C, Del Fiore G, Aerts J, Luxen A, Maquet P (2004) Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? *Neuron* 44:535-545.

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700-704.

Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, Dewhirst MW, Sankar S (2004) Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res* 59:51-71.

Petrillo M, Scambia G, Ferrandina G (2012) Novel targets for VEGF-independent anti-angiogenic drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 21:451-472.

Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF (2000) Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 80:99-115.

Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC (2004) Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 279:12171-12180.

Pires PW, Dams Ramos CM, Matin N, Dorrance AM (2013) The effects of hypertension on the cerebral circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H1598-H1614.

Posadas-Andrews A, Roper TJ (1983) Social transmission of food preferences in adult rats. *Animal Behaviour* 31:265-271.

Price JL (2007) Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. *Ann N Y Acad Sci* 1121:54-71.

Q

Qin YL, McNaughton BL, Skaggs WE, Barnes CA (1997) Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352:1525-1533.

Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P (2011) Neuron. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71:406-424.

R

Rancillac A, Geoffroy H, Rossier J (2012) Impaired neurovascular coupling in the APPxPS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9:1221-1230.

Rasch B, Buchel C, Gais S, Born J (2007) Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science* 315:1426-1429.

Religa P, Cao R, Religa D, Xue Y, Bogdanovic N, Westaway D, Marti HH, Winblad B, Cao Y (2013) VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci Rep* 3:2053.

Restivo L, Roman FS, Ammassari-Teule M, Marchetti E (2006) Simultaneous olfactory discrimination elicits a strain-specific increase in dendritic spines in the hippocampus of inbred mice. *Hippocampus* 16:472-479.

Ribeiro S, Gervasoni D, Soares ES, Zhou Y, Lin SC, Pantoja J, Lavine M, Nicolelis MA (2004) Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biol* 2:E24.

Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM (1998) Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7086-7091.

Ross RS, Eichenbaum H (2006) Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J Neurosci* 26:4852-4859.

S

Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV (2012) Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a011452.

Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, Alitalo K (2011) VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med* 17:347-362.

Sánchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM (2005) Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev* 51:547-558.

Savineau JP, Marthan R (1997) Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam Clin Pharmacol* 11:289-299.

Sawamiphak S, Ritter M, Acker-Palmer A (2010) Preparation of retinal explant cultures to study ex vivo tip endothelial cell responses. *Nat Protoc* 5:1659-1665.

- Schaffer CB, Friedman B, Nishimura N, Schroeder LF, Tsai PS, Ebner FF, Lyden PD, Kleinfeld D (2006) Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biol* 4:e22.
- Segal M (2005) Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6:277-284.
- Sejnowski TJ (1995) Neural networks. Sleep and memory. *Curr Biol* 5:832-834.
- Shadmehr R, Holcomb HH (1997) Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* 277:821-825.
- Silvestrini M, Gobbi B, Pasqualetti P, Bartolini M, Baruffaldi R, Lanciotti C, Cerqua R, Altamura C, Provinciali L, Vernieri F (2009) Carotid atherosclerosis and cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 30:1177-1183.
- Sirotnin YB, Das A (2009) Anticipatory haemodynamic signals in sensory cortex not predicted by local neuronal activity. *Nature* 457:475-479.
- Somlyo AP, Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372:231-236.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177.
- Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13515-13522.
- Squire LR, Kandel ER (1999) Memory From Mind to Molecules. Scientific American Library.
- Squire LR, Stark CE, Clark RE (2004) The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27:279-306.
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, Aggleton JP (1998) Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. *Prog Neurobiol* 54:313-332.
- Strupp BJ, Levitsky DA (1984) Social transmission of food preferences in adult hooded rats. *Journal of Comparative Psychology* 98:257-266.
- Stuchlik A (2014) Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci* 8:106.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111:1843-1851.

T

Tabruyn SP, Colton K, Morisada T, Fuxe J, Wiegand SJ, Thurston G, Coyle AJ, Connor J, McDonald DM (2010) Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. *Am J Pathol* 177:3233-3243.

Takehara K, Kawahara S, Kirino Y (2003) Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 23:9897-9905.

Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7555-7564.

Tong XK, Lecrux C, Rosa-Neto P, Hamel E (2012) Age-dependent rescue by simvastatin of Alzheimer's disease cerebrovascular and memory deficits. *J Neurosci* 32:4705-4715.

Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5919-5924.

Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. In: Organization of memory (Tulving E, Donaldson W, eds), pp 381-403. New York Academic Press.

V

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1-20.

Vetere G, Restivo L, Cole CJ, Ross PJ, Ammassari-Teule M, Josselyn SA, Frankland PW (2011) Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8456-8460.

Vincent P, Maskos U, Charvet I, Bourgeois L, Stoppini L, Leresche N, Changeux JP, Lambert R, Meda P, Paupardin-Tritsch D (2006) Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO Rep* 7:1154-1161.

W

Wallace CS, Withers GS, Farnand A, Lobingier BT, McCleery EJ (2011) Evidence that angiogenesis lags behind neuron and astrocyte growth in experience-dependent plasticity. *Dev Psychobiol* 53:435-442.

Wang H, Hu Y, Tsien JZ (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79:123-135.

Wang P, Xie ZH, Guo YJ, Zhao CP, Jiang H, Song Y, Zhu ZY, Lai C, Xu SL, Bi JZ (2011) VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 411:620-626.

Weible AP (2013) Remembering to attend: the anterior cingulate cortex and remote memory. *Behav Brain Res* 245:63-75.

Whishaw IQ, Tomie J, Kolb B (1992) Ventrolateral prefrontal cortex lesions in rats impair the acquisition and retention of a tactile-olfactory configural task. *Behav Neurosci* 106:597-603.

Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J (2014) Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature* 505:407-411.

Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.

Wilson DE, Reeder DA (2006) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Winocur G, McDonald RM, Moscovitch M (2001) Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions. *Hippocampus* 11:18-26.

Wittenberg GM, Sullivan MR, Tsien JZ (2002) Synaptic reentry reinforcement based network model for long-term memory consolidation. *Hippocampus* 12:637-647.

Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rösel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F (2000) PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60:2178-2189.

Wray S, Burdyga T (2010) Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90:113-178.

X

Xing C, Hayakawa K, Lok J, Arai K, Lo EH (2012) Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurol Res* 34:325-330.

Xiong Y, Zhang Y, Mahmood A, Meng Y, Qu C, Chopp M (2011) Erythropoietin mediates neurobehavioral recovery and neurovascular remodeling following traumatic brain injury in rats by increasing expression of vascular endothelial growth factor. *Transl Stroke Res* 2:619-632.

Y

Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H (2004) Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 14:861-875.

Yang GY, Xu B, Hashimoto T, Huey M, Chaly T Jr, Wen R, Young WL (2003) Induction of focal angiogenesis through adenoviral vector mediated vascular endothelial cell growth factor gene transfer in the mature mouse brain. *Angiogenesis* 6:151-158.

Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S (2011) Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)* 40:155-160.

Z

Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, Feng Y, Gao Q, Chopp M (2007) Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1684-1691.

Zhang L, Lü L, Chan WM, Huang Y, Wai MS, Yew DT (2012) Effects of DL-3-n-butylphthalide on vascular dementia and angiogenesis. *Neurochem Res* 37:911-919.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

Annexes

Poster présenté à la Journée de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé en 2013: Functional implication of the cerebral vascular network in memory consolidation

Poster présenté au congrès de la Society for Neuroscience en 2013: Effects of intracerebral VEGF injections on microvascular density and hippocampal-dependent memory

Liste des abréviations

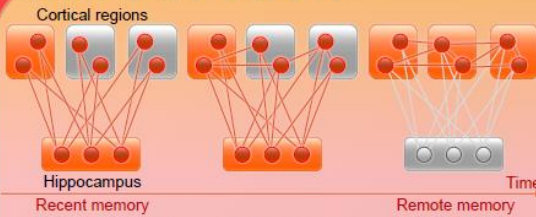
Liste des figures

Functional implication of the cerebral vascular network in memory consolidation

Anais GIACINTI, Bruno BONTEMPI and Nathalie MACREZ.

Institut des Maladies Neurodégénératives, CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux.

Introduction



After a new experience, recent memory is dependent on the hippocampus. Time-limited hippocampal-cortical interactions increase progressively the strength and stability of cortical-cortical connexions that represent the original experience. Remote memory is finally embedded into the cortex and becomes independent of the hippocampus (Squire *et al.*, 1995 ; Frankland and Bontempi, 2005). A vascular reorganization during memory consolidation is possible, since blood flow distribution depends on the metabolic demand of neurons (Iadecola, 2004). Accordingly, angiogenesis has been shown to occur during learning (Black *et al.*, 1987) and to be important for memory encoding (Kerr *et al.*, 2010). Yet, the vascular contribution to memory consolidation has remained unexplored.

To determine whether consolidation triggers vascular plasticity phenomena, we first adopted a **correlative approach** which consisted in examining potential changes in structure and reactivity of cerebral blood vessels. This was coupled to an **invasive approach** (preliminary results) which consisted in manipulating angiogenesis, to determine its functional implication in this process.

Behavioral task

We used the social transmission of food preference task in male Sprague Dawley rats.

1- **Exposure**: a food-deprived demonstrator (D) eats cumin flavored food.



2- **Social interaction**: an observer rat (O) forms an association between the cumin odor and some constituents of the breath of D. Thus O learns that cumin is safe to eat. This associative olfactory information is important enough to be consolidated (in one month).

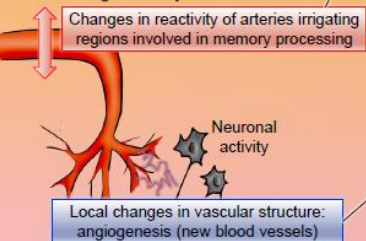


3- **Retrieval test**: Sprague Dawley rats have an innate preference for thyme versus cumin, when confronted to a choice between these two novel foods. The interaction reverses this preference, so that O now prefers cumin food. Memory performance is expressed as percentage of cumin food eaten.



Correlative approach

What kind of vascular changes may occur during memory consolidation?



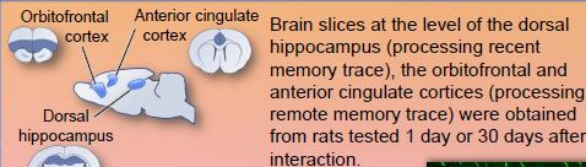
We examined whether the **structure** and **reactivity** of the vascular network change during memory consolidation.

Experimental design:

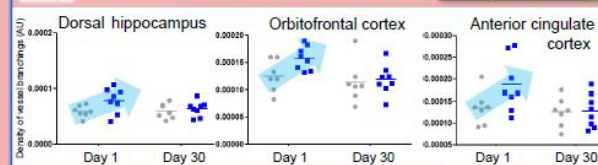


Experimental (exp) rats learn a new associative olfactory memory. Control (ctrl) rats interact with a demonstrator fed with familiar food and do not learn it.

Does memory consolidation induce changes in the structure of the vascular network irrigating brain regions involved in recent and remote memory retrieval?

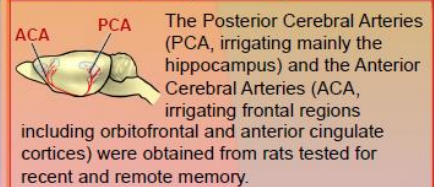


These slices were immunostained with lectin to visualize the vascular network. Densities of blood vessels and vessel branchings were analyzed.

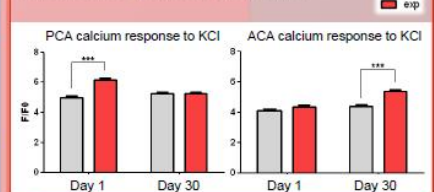


Branching density increases one day after learning in the hippocampus, and in the orbitofrontal and anterior cingulate cortices. This increase is not maintained over time.

Does memory consolidation induce changes in the reactivity of arteries irrigating these regions?



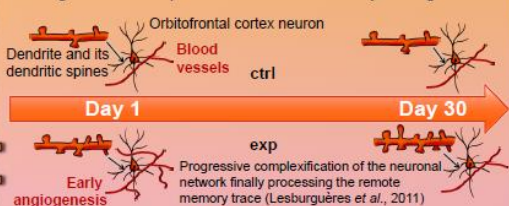
We analysed calcium reactivity, an indirect way to study the ability of arteries maintained *ex vivo* to constrict in response to a stimulus.



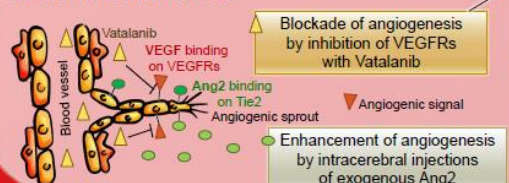
Calcium response increase in arteries is related to the regions processing the memory trace.

Invasive approach

We focus here on this early angiogenesis in cortical regions. Is it required for remote memory storage?



We tested whether early **blockade** (enhancement) of angiogenesis **impairs** (improves) remote memory retrieval by impacting on the development of a new cortical neuronal network.



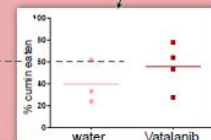
Does the early blockade of angiogenesis by systemic Vatalanib injections impair remote memory retrieval?

Vatalanib inhibits predominantly VEGF receptors of type 2, a major actor of the angiogenic process. All rats interacted with a demonstrator fed with cumin.

Rats received repeated *per os* injections of Vatalanib (50mg/kg) or water from D-1 to D6.



Usual performance of control group (water)



Remote memory retrieval seems unimpaired by Vatalanib. Necessity to develop a cerebral model of angiogenesis, to test the efficacy of Vatalanib treatment and of AAV9 expressing a shRNA anti-Ang2 (production by N. Dutheil).

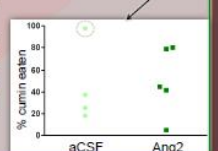
Does the early enhancement of angiogenesis by intracortical injections of Angiopoietin-2 improve remote memory retrieval?

Angiopoietin-2 (Ang2) is another major actor of angiogenesis. It is thought to be specific of blood vessels, allowing us to inject it directly into the cortex. All rats interacted with a demonstrator fed with cumin.

Repeated bilateral intra-orbitofrontal cortex injections of Ang2 (100ng in 1µL) or aCSF (control group)



Grids were left during the whole interaction to prevent a ceiling effect in the performance of the control group (aCSF)



Preliminary findings show that remote memory retrieval in rats infused with Ang2 tends to be improved.

Conclusion and perspectives

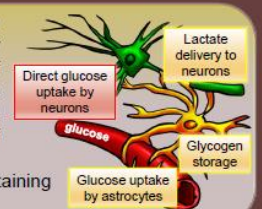
Early cortical angiogenesis may participate to the initial maturation of remote memories while later changes in reactivity might support expression and use of remote consolidated memories.

Experiments on early angiogenesis and plasticity of neuronal networks in cortical regions will be completed by:

- > Counting dendritic spines of cortical neurons and determining the outcome of angiogenesis blockade or enhancement ;
- > Finding a neuronal inducer of angiogenesis.

Why is early angiogenesis not maintained over time while dendritic spines continue to increase up to day 30? Angiogenesis could refill the glycogen stores of astrocytes (see right) during the early phase of the consolidation process. These astrocytes could in turn provide energy to neurons during the later phase of memory consolidation.

- > Establish the time course of cortical glycogen staining during the 30 days following interaction.



Effects of intracerebral VEGF injections on microvascular density and hippocampal-dependent memory

670.16/JJJ53

A. GIACINTI^{1,2}, O. NICOLE^{1,2}, N. BIENDON^{1,2}, B. BONTEMPI^{1,2}, N. MACREZ^{1,2}, ¹Univ. de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France. ²CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, F-33000 Bordeaux, France.

Contact : anais.giacinti@etud.u-bordeaux2.fr

Acknowledgements: AMX (Ecole Polytechnique), CNRS, ANR Corehabis

Introduction

Local blood flow is adjusted dynamically according to metabolic demands of neurons (Iadecola. *Nat Rev Neurosci*. 2004 May; 5(5):347-60). Memory acquisition has been shown to require structural changes of the vascular network (Kerr *et al.* *Neuroscience*. 2010 Nov 24; 171(1):214-26) and angiogenesis inducers have proven effective in alleviating memory impairment after traumatic brain injury (Xiong *et al.* *Transl Stroke Res*. 2011 Dec 1; 2(4):619-632) and in transgenic mouse models of Alzheimer's disease (Wang *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 5; 411(3):620-6). However, apart from illness and injury, to what extent an increase in the complexity of the vascular network can impact memory functions remains uncertain.

To this end, we first established the kinetics of vascular remodeling following one single injection of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) into two different brain regions, the orbitofrontal cortex and the dorsal hippocampus. We then examined whether increased hippocampal angiogenesis could modulate novel place recognition memory.

Methods

Surgery: adult male Sprague-Dawley rats were equipped with bilateral guide cannulae targeting the orbitofrontal cortex (AP +4.2; Lat +1.2; DV -4.1) or the dorsal hippocampus (AP -3.8; Lat +4.2; DV -3.5).

Injection: 1 μ L of aCSF or VEGF (at a dose of 10 ng/ μ L) or CNQX (at a dose of 3 mM) was delivered in freely moving rats at a rate of 0.8 μ L/min. A delay of one month between guide cannula implantation and injections was selected to minimize confounding inflammatory phenomena observed at shorter delays.

Perfusion: rats were perfused at different delays following the intracerebral injections with a heparinized solution of 0.9% NaCl (200 mL), 0.9% NaCl (100 mL) and cold 4% paraformaldehyde (300 mL). Brains were removed and sliced into 40 μ m sections using a vibratome.

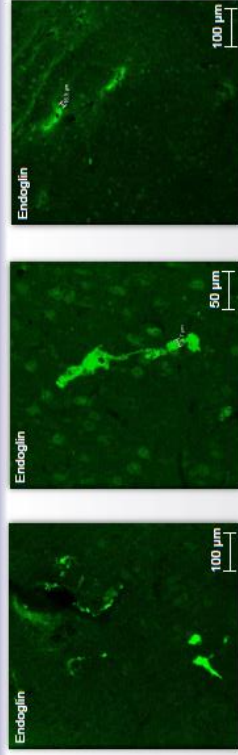
Immunofluorescence: sections were stained with Lectin (Lectin RCA₁₂₀ tagged FITC, 1/100, Vector), or with specific antibodies directed against Endoglin (goat anti-Endoglin, 1/200, Santa Cruz; donkey anti-goat 488 nm, 1/200, Fluoroprobes) or Tie-2 (rabbit anti-Tie-2, 1/400, Santa Cruz; goat anti-rabbit 488 nm, 1/200, Fluoroprobes). Images were acquired using confocal microscopy (Leica SP5).

Novel place recognition memory task (NPR): this task is based on the innate preference of rats for novelty.

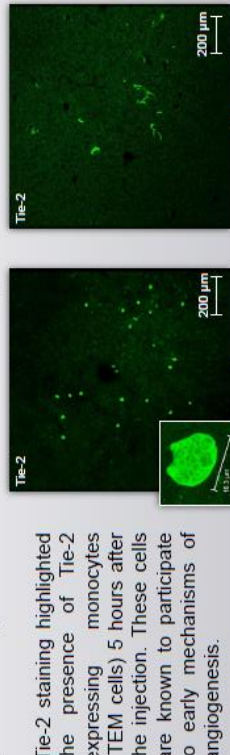


Rats underwent one session of 10 min of habituation to the arena (a) each of the 3 days preceding familiarization. During familiarization (b), 2 identical objects were placed in two corners of the arena, with the rat facing the opposite direction; the exploration session stopped after 1 min of interaction with any object. Novel place recognition memory was tested 24 h later (c): one of the objects was moved to another corner. The index of memory performance was calculated as the time spent exploring the moved object divided by the total time of interaction with any object (set to 15 sec).

Endothelial cells proliferate 5h to 48h following one single VEGF injection



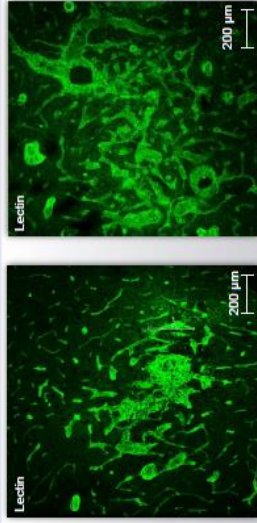
Proliferating endothelial cells were immunostained with an anti-Endoglin antibody. A peak of staining was observable 24 hours after the injection of VEGF.



Tie-2 staining highlighted the presence of Tie-2-expressing monocytes (TEM cells) 5 hours after the injection. These cells are known to participate to early mechanisms of angiogenesis.

These pictures were taken at the level of the orbitofrontal cortex (OFC) 5 hours, 24 hours or 48 hours after a VEGF injection into the OFC. Results were similar after a VEGF injection into the dorsal hippocampus. No or very little Tie-2 or Endoglin staining was observed after aCSF injections (not shown).

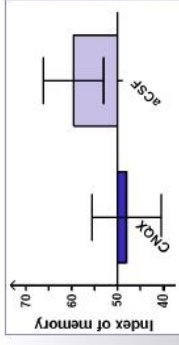
Blood vessels density is enhanced 4 days after one single VEGF injection



Blood vessels were stained with Lectin-FITC. These pictures were taken at the level of the OFC 2 or 4 days after a VEGF injection into the OFC. Results were similar after a VEGF injection into the dorsal hippocampus.

Such a dense and tortuous vascular network, composed of dilated blood vessels was not observed following aCSF injections.

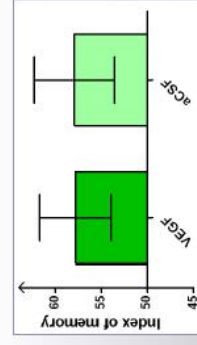
Novel place recognition memory is dependent on the hippocampus



1 μ L of CNQX/aCSF was injected one hour before familiarization into the dorsal hippocampus, rats were tested 24 hours later (n=6,8).

CNQX-treated rats were impaired and performed at chance level: the dorsal hippocampus is thus required to form a novel place recognition memory in our experimental conditions. Results are being completed.

VEGF injection 4 days before learning does not improve novel place recognition memory



1 μ L of VEGF (10 ng) or aCSF was injected 4 days before familiarization into the dorsal hippocampus, rats were tested 24 hours later. No effect of VEGF on novel place recognition memory was observed (n=12,13; p=0,99). This is consistent with Licht *et al.* (PNAS. 2011 Mar 22; 108(12):5081-6).

When injected 1 day before familiarization (to induce a more « flexible » vascular network during learning), VEGF remains without effect on novel place recognition memory tested 24 hours later (n=4,5).

Conclusions and future directions

Endothelial cells proliferated 5h to 48h following one single injection of VEGF into the OFC or the dorsal hippocampus, leading to the development of a tortuous and dense vascular network 4 days later. However, these VEGF-induced vascular changes failed to impact memory performance as measured in the NPR task, indicating that they were not functionally relevant when VEGF was given prior to testing in the NPR task.

This study will be replicated by administering VEGF before radial maze training, a more challenging hippocampus-dependent memory task in which a denser vascular network might reveal more beneficial for spatial memory processing.

Liste des abréviations

6-FAM	6-carboxy Fluorescéine AMidite
AAV	Virus Adéno-Associé
ACA	Artère Cérébrale Antérieure
ACP	Artère Cérébrale Postérieure
aCSF	Fluide CérébroSpinal artificiel
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
Ang-1	Angiopoïétine 1
Ang-2	Angiopoïétine 2
ANOVA	Analyse de Variance
AP	Antéro-Postérieur
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BrdU	5-Bromo-2'-déoxyUridine
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CA1	Aire 1 de la Corne d'Amon de l'hippocampe
CA2	Aire 2 de la Corne d'Amon de l'hippocampe
CA3	Aire 3 de la Corne d'Amon de l'hippocampe
CaM	CalModuline
CCA	Cortex Cingulaire Antérieur
CICR	Libération de Calcium Induite par le Calcium
CNQX	6-Cyano-7-NitroQuinoXaline-2,3-dione
COF	Cortex Orbito-Frontal
CP	Cortex Pariétal
CPFm	Cortex PréFrontal médian
ctrl	contrôle (témoin)
Cy	Cyanine
DV	Dorso-Ventral
exp	expérimental
FGF	Facteur de Croissance des Fibroblastes
FITC	IsoThioCyanate de Fluorescéine
GABA	Acide γ -AminoButyrique

GD	Gyrus Denté
GFP	Protéine Fluorescente Verte
HD	Hippocampe Dorsal
HIF	Facteur Inductible par Hypoxie
InsP₃R	Récepteur à l'Inositol 1,4,5-trisPhosphate
i.p.	intrapéritonéal
J1, J30...	Jour 1, Jour 30...
KCl	Chlorure de Potassium
Lat	Latéral
MLCK	Kinase de la Chaîne Légère de la Myosine
MMP	MétalloProtéase Matricielle
NO	Oxyde Nitrique
NRP	NeuRoPiline
NS	Non Significatif
ONAS	OligoNucléotide AntiSens
PB	Tampon Phosphate
PDGF-β	Facteur de Croissance de type β Dérivé des Plaquettes
PDGFR-β	Récepteur au PDGF- β
PHD	Prolyl-Hydroxylases
qPCR	Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative
RECA-1	Antigène-1 Cellulaire de l'Endothélium de Rat
RISC	(<i>en anglais</i>) RNA-Induced Silencing Complex
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la Ryanodine
SEM	Erreur Standard de la Moyenne
SERCA	Ca-ATPase du Réticulum Sarco-Endoplasmique
shRNA	petit ARN en épingle à cheveux
siRNA	petit ARN interférent
TSPA	Transmission Sociale de Préférence Alimentaire
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
VEGFR	Récepteur au VEGF

Liste des figures

Introduction générale

Fig n°		page
1	Les différents systèmes de mémoire à long terme et les régions cérébrales sur lesquelles ils reposent	4
2	Décours temporel des processus de consolidation mnésique	5
3	Le modèle standard de la consolidation mnésique	6
4	Déroulement du test de TSPA	9
5	Reconstruction du réseau vasculaire d'un cerveau de souris	13
6	Principe du mécanisme d'autorégulation	14
7	Vue de la base d'un cerveau de souris	14
8	Vues d'une coupe sagittale et frontale montrant les deux ACA et leurs subdivisions, et d'une coupe sagittale et frontale montrant les deux ACP et leurs subdivisions	15
9	L'unité neurovasculaire	17
10	Propagation de la réponse vasculaire suite à une activation du cortex somatosensoriel	19
11	Plasticité vasculaire chez la souris	22
12	Le cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire antérieur et l'hippocampe constituent nos régions cérébrales d'intérêt	24
13	Timing du processus de consolidation mnésique dans le test de TSPA	25
14	Adaptations vasculaires susceptibles de se produire en réponse à l'activité neuronale	25

Etude corrélative : réactivité vasculaire

15	Effet d'une stimulation électrique sur les variations de calcium intracellulaire au sein d'un astrocyte et d'une cellule musculaire lisse adjacente et sur les oscillations spontanées du diamètre des artérioles	28
16	Différents acteurs de la signalisation calcique dans une cellule musculaire lisse vasculaire	30
17	Activation de l'appareil contractile par le complexe calcium-calmoduline	31
18	Sparks ou vagues calciques au sein des cellules musculaires lisses entourant les artérioles intracérébrales et les artères piales	32
19	Design expérimental	33
20	Résultats de la tâche de TSPA	34
21	Quantité totale de nourriture consommée (cumin + thym) au cours du test de préférence par les rats analysés ensuite en imagerie calcique	35
22	Réponse des cellules musculaires lisses des ACP de diamètre inférieur à 35 microns provenant de rats témoins et expérimentaux, en fonction de l'intervalle de rétention	36
23	Réponse des cellules musculaires lisses des ACA de diamètre inférieur à 35 microns provenant de rats témoins et expérimentaux, en fonction de l'intervalle de rétention	37
24	Schéma de l'expérience complémentaire permettant d'étudier la réactivité in vivo et ex vivo des vaisseaux cérébraux irriguant une zone cible d'activité neuronale	41

Etude corrélative : architecture vasculaire

25	Différents modes d'angiogenèse peuvent se mettre en place dans les tissus adultes après injection de VEGF	45
26	Etapes de l'angiogenèse par « sprouting » et acteurs moléculaires	46
27	Angiopoïétines et stabilité des vaisseaux	48
28	Design expérimental	50
29	Images représentatives du marquage du réseau vasculaire	51
30	Traitement des images	51
31	Résultats de la tâche de TSPA	52
32	Quantité totale de nourriture consommée (cumin + thym) au cours du test de préférence par les rats analysés ensuite	53
33	Densité de vaisseaux sanguins au sein de 4 structures cérébrales de rats expérimentaux et contrôles	54
34	Densité d'embranchements vasculaires au sein de 4 structures cérébrales de rats expérimentaux ou contrôles	55
35	Design expérimental (BrdU)	57
36	Hippocampe de rat, et ses différentes régions	58
37	Nombre moyen par coupe de cellules doublement marquées au BrdU et au Collagène IV pour des rats expérimentaux ou contrôles	58
38	Prolifération cellulaire au sein du cortex cingulaire antérieur	59
39	Prolifération cellulaire au sein du gyrus denté	60
40	Schéma récapitulatif des 2 premiers chapitres de résultats	61
41	Densité d'épines dendritiques mesurée sur des neurones du cortex orbitofrontal, chez des rats témoins et expérimentaux ayant participé à la tâche de TSPA, 1 jour ou 30 jours après l'interaction	62
42	Immunomarquage de la protéine Hif-1 α sur des coupes de cortex orbitofrontal d'un rat expérimental et d'un rat contrôle, tous deux testés puis euthanasiés immédiatement après le rappel, 24h après l'interaction sociale	64

Etude invasive : modulation de l'angiogenèse

43	L'injection systémique de Vatalanib bloque l'angiogenèse en inhibant les récepteurs au VEGF et ceux au PDGF- β	68
44	Mode d'action de drogues anti-angiogéniques ciblant l'axe Ang-2/Tie2	69
45	Protocole expérimental général	71
46	Protocole expérimental	73
47	Résultats du test de TSPA à J1 après 2 injections i.p. de Vatalanib à 50mg/kg	73
48	Protocole expérimental	74
49	Résultats du test de TSPA à J30 après une injection i.p. de Vatalanib à 25mg/kg ..	75
50	Protocole expérimental	75
51	Résultats du test de TSPA à J30 après 5 injections i.p. de Vatalanib à 25mg/kg ...	76
52	Protocole expérimental	76
53	Résultats du test de TSPA à J30 après 8 injections per os de Vatalanib à 50mg/kg	77
54	Protocole expérimental	78
55	Résultats du test de TSPA à J30 des rats ayant reçus 4 injections intracérébrales de Vatalanib à 2ng/ μ L	78
56	ONAS taggés avec Cy3 au sein de vaisseaux sanguins	80

57	Protocole expérimental	81
58	Résultats de la tâche de TSPA à J30 après 4 injections d'ONAS anti-Ang-2	82
59	Coupes de rats ayant reçu des injections d'ONAS ou scramble (6µg/µL) taggés avec un fluorophore FAM	83
60	Protocole expérimental	83
61	Coupes de rats ayant reçu des injections d'ONAS (3µg/µL, 1µg/µL ou 0,5µg/µL) taggés avec un fluorophore FAM	84
62	Marquage révélant l'expression de la protéine GFP (en vert) et ainsi la diffusion et l'intégration au sein du cortex orbitofrontal des AAV-shRNA Ang2-GFP, injectés 15 jours auparavant dans cette région	85
63	Protocole expérimental	86
64	Protocole expérimental	87
65	Résultats de la tâche de TSPA	87
66	Résultats comportementaux des rats ayant reçu des injections intracorticales d'Ang-2 ou d'aCSF	88
67	Résultats au test de rétention à J30 de rats qui ont reçu suivant le même protocole de l'Ang-2 ou de l'aCSF, après avoir interagi avec un démonstrateur ayant mangé de la nourriture habituelle	89
68	Densité de vaisseaux sanguins et d'embranchements vasculaires dans la zone injectée de façon répétée	89
69	S'il ne franchit pas la BHE, le Vatalanib peut devenir inefficace	92

Un principe généralisable ?

70	Rat réalisant une tâche de reconnaissance de nouvelle position d'objet	98
71	Les phases du test de reconnaissance de nouvelle position d'objet	99
72	Les phases du test de labyrinthe radiaire	100
73	Protocole expérimental	102
74	Marquage Tie2 de la zone corticale entourant les guides canules	103
75	Marquage Endogline vasculaire 5h, 24h et 48h après injection de VEGF	104
76	Marquage lectine 4 jours après injection de VEGF ou d'aCSF dans l'hippocampe et le cortex orbitofrontal	104
77	Protocole expérimental	106
78	Résultats au test de reconnaissance de nouvelle position après injection de CNQX .	106
79	Protocole expérimental	107
80	Résultats au test de reconnaissance de nouvelle position après injection de VEGF ..	107
81	Protocole expérimental et résultats au test de reconnaissance de nouvelle position d'objet	108
82	Protocole expérimental	109
83	Acquisition de la tâche (J0 à J8) et test en rétention (J15)	110
84	Test de reversal (J16 à J18)	111
85	Pourcentage moyen de bons choix effectués sur les 3 premiers bras visités lors des 6 essais du premier jour d'acquisition (J0) ou de reversal (J16)	111
86	Analyse du réseau vasculaire au sein de l'hippocampe dorsal	112
87	Résultat du test de TSPA réalisé à J30 sur des rats ayant reçu des injections de VEGF ou d'aCSF	114

Discussion générale

88	Schéma faisant la synthèse des principaux résultats	120
89	Angiogenèse et épines	123
90	Schéma récapitulatif des implications (démonstrées ou probables) des différentes régions dans le processus de consolidation mnésique	127
91	Localisation du CCA, du COF, de l'HD, du CPFm et du cortex piriforme, ainsi que des ACA et des ACP	128
92	Nombre de contacts nez-nez entre observateur et démonstrateur par blocs de 5 minutes pendant l'interaction sociale	129
93	Résultats au test de TSPA réalisé à J60, pour des rats ayant interagi avec un démonstrateur « plain » ou cumin	130
94	Durée moyenne des contacts nez-nez lors de l'interaction sociale, avec grille tout du long ou en enlevant la grille les 10 dernières minutes	131

Matériels et méthodes

95	Déroulé du test de TSPA	137
96	Déroulé du test de reconnaissance de nouvelle position d'objet	138
97	Le labyrinthe radiaire	139
98	Déroulé du test de labyrinthe radiaire	140
99	Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler le cortex orbitofrontal	141
100	Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler le cortex cingulaire antérieur	142
101	Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour cibler l'hippocampe dorsal	142
102	Carte de construction du virus	144
103	Vaisseaux prélevés	146
104	Boîte de culture contenant un vaisseau collé au Cell Tak sur une lamelle	146
105	Imagerie au microscope confocal	147
106	Réponse des artères cérébrales aux médiateurs	148
107	Régions cérébrales d'intérêt, représentées en rouge sur la coupe sagittale de cerveau de rat et les coupes frontales correspondantes	150
108	Analyse des images	151